

【特許請求の範囲】

【請求項1】 固形自由造形製作により形成された、組織操作のための多孔性デバイスであって、以下：

第1細胞型の接着、増殖、および／または分化を促進するように選択された、第1の孔サイズ、孔隙率、マクロアーキテクチャ、ミクロアーキテクチャ、および組成を有する、第1領域、

該第1領域に継ぎ目なしで連結された第2領域であって、該第2領域は、（i）第2細胞型の接着、増殖、および／または分化を促進するようにか、または（i i）該第1細胞型または該第2細胞型のいずれかの接着または増殖を制限するように選択された、第2の孔サイズ、孔隙率、マクロアーキテクチャ、ミクロアーキテクチャ、および／または組成を有する、第2領域、
を含み、ここで該第1領域および該第2領域の各々は、層剥離を回避するように適合した孔サイズ、孔隙率、マクロアーキテクチャ、ミクロアーキテクチャ、および／または組成の勾配を有する、多孔性デバイス。

【請求項2】 前記第1領域と前記第2領域との間で、該第1領域と該第2領域を継ぎ目なしで連結する、孔サイズ、孔隙率、および／または組成の移行帯または勾配をさらに含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項3】 前記第1領域および前記第2領域が、粉末の形態にあるポリマー性材料から、三次元プリンティングを使用して製作される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項4】 少なくとも1つの領域における前記孔隙率が、約90%以上である、請求項1に記載のデバイス。

【請求項5】 少なくとも1つの領域または1つの領域内の勾配が、骨原性材料、骨誘導性材料および／または骨伝導性材料を含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項6】 細胞接着を増大させるかまたは構造的特性を与える、生物活性剤、診断剤、または非ポリマー性粒子をさらに含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項7】 前記生物活性剤が、細胞または特定の細胞型の分化、増殖、

および／または接着を増大させる、請求項6に記載のデバイス。

【請求項8】 少なくとも1つの領域で分散された、規定された直径を有する浸出可能な塩の粒子をさらに含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項9】 少なくとも1つの前記領域が、実質的に、チューブ、コイル、クローバー、反転クローバー、蜂の巣、およびスロットからなる群から選択される形態にある断面の設計を有する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項10】 少なくとも1つの領域の前記マイクロアーキテクチャが、細胞の取り込みおよび／または組織の内殖を促進する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項11】 少なくとも1つの領域の前記マイクロアーキテクチャが、細胞の取り込みおよび／または組織の内殖を制限する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項12】 少なくとも1つの領域の表面が、界面活性剤、細胞接着ペプチド、または生物活性剤により改変される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項13】 少なくとも1つの領域、前記移行帯またはその両方が、2つ以上の材料の混合物の層を含み、ここで該層は共に、該少なくとも1つの領域、該移行帯またはその両方内で、2つ以上の該材料の勾配を与える、請求項2に記載のデバイス。

【請求項14】 前記材料の一方が浸出可能であり、そして該材料の他方が浸出可能ではない、請求項13に記載のデバイス。

【請求項15】 前記浸出可能な材料が塩化ナトリウムである、請求項14に記載のデバイス。

【請求項16】 前記混合物がさらに、無機粒子を含む、請求項13に記載のデバイス。

【請求項17】 前記無機粒子が、骨、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項16に記載のデバイス。

【請求項18】 前記ポリマー性材料が、ポリ(α)エステル、ポリ(ε-カプロラクトン)、ポリ酸無水物、ポリアリーレート、ポリホスファゼン、ポリ

ヒドロキシアлкаノエート、およびポリサッカリドからなる群から選択されるポリマーを含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項19】 前記ポリマーが、ポリ（乳酸－コ－グリコール酸）またはポリ（乳酸）である、請求項18に記載のデバイス。

【請求項20】 前記ポリ（乳酸－コ－グリコール酸）が、前記ポリマーの分解の速度を増加させるために遊離酸性側鎖を有する、請求項19に記載のデバイス。

【請求項21】 前記ポリマー性材料が、コアセルベート化粒子から形成される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項22】 前記コアセルベート化粒子が、ポリマーでコーティングされた非ポリマー性粒子である、請求項21に記載のデバイス。

【請求項23】 前記非ポリマー性粒子が、骨粒子、ヒドロキシアパタイト粒子、およびリン酸カルシウム粒子からなる群から選択される、請求項22に記載のデバイス。

【請求項24】 前記粒子が、ポリ（乳酸－コ－グリコール酸）でコーティングされる、請求項22または23に記載のデバイス。

【請求項25】 前記第1領域が骨再生領域であり、そして前記第2領域が軟骨再生領域である、請求項1に記載のデバイス。

【請求項26】 前記軟骨領域の孔隙率が約90%以上であり、そして該軟骨領域の孔サイズが38 μm 以上である、請求項25に記載のデバイス。

【請求項27】 前記軟骨領域の孔サイズが約106 μm と150 μm との間である、請求項26に記載のデバイス。

【請求項28】 前記骨領域の孔隙率が約35%と55%との間であり、そして前記孔サイズが約125 μm と150 μm との間である、請求項25～27のいずれかに記載のデバイス。

【請求項29】 前記骨領域がクローバー形状を有する、請求項25～28のいずれかに記載のデバイス。

【請求項30】 前記骨領域が蜂の巣形状または中空円筒形状を有する、請求項25～27のいずれかに記載のデバイス。

【請求項31】 前記骨領域が、3：1の比率のポリ（乳酸－コーグリコール酸）対リン酸三カルシウムまたはヒドロキシアパタイトを含む、請求項25～31のいずれかに記載のデバイス。

【請求項32】 前記骨領域が55%の塩をさらに含む、請求項31に記載のデバイス。

【請求項33】 前記軟骨領域が1：1の比率のポリ（乳酸－コーグリコール酸）およびポリ（乳酸）を含む、請求項25～31のいずれかに記載のデバイス。

【請求項34】 前記軟骨領域が90%の塩を含む、請求項33に記載のデバイス。

【請求項35】 前記第1領域と前記第2領域との間の移行領域をさらに含む、請求項25～34のいずれかに記載のデバイス。

【請求項36】 前記移行領域が、軟骨領域から骨領域へと、85%から65%への塩の勾配、10%から5%への1：1ポリ（乳酸－コーグリコール酸）（50：50）：ポリ（乳酸）の勾配、および5%から30%へのポリ（乳酸－コーグリコール酸）（85：15）の勾配を含む、請求項35に記載のデバイス。

【請求項37】 1つ以上の前記領域および移行帯がさらに、細胞播種および増殖のために適切な1つ以上の巨視的チャンネルを含む、請求項2に記載のデバイス。

【請求項38】 チャンネルの2つ以上の層を有する請求項37に記載のデバイスであって、ここで1つの層の該チャンネルは、隣接する層の該チャンネルに関して千鳥形の配向、オフセットの配向またはその両方にある、請求項37に記載のデバイス。

【請求項39】 前記層内のチャンネルが、前記デバイスを通じて完全に伸長する流路を形成する、請求項38に記載のデバイス。

【請求項40】 前記層内のチャンネルが、前記デバイスを通じて完全には伸長しない流路を形成する、請求項38に記載のデバイス。

【請求項41】 前記チャンネルが、前記層に対して垂直な軸に関して約90

。オフセットである、請求項38に記載のデバイス。

【請求項42】 細胞が、インビトロで前記デバイスの1つ以上の領域から、該1つ以上の領域の孔サイズおよび／または孔隙率によって選択的に排除される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項43】 細胞が、インビボで前記1つ以上の領域において増殖する、請求項42に記載のデバイス。

【請求項44】 少なくとも1つの領域を、インビトロでの細胞接着を予防するための材料で処理するが、ここにおいて細胞はインビボでは成長する、請求項1に記載のデバイス。

【請求項45】 前記第1領域は負荷を保有する重量に適切であり、そして前記第2領域は軟部組織の再生に適切である、請求項1に記載のデバイス。

【請求項46】 軟骨の再生のためのデバイスであって、以下：

ポリマーの三次元プリンティングにより形成される多孔性マトリクスであって

、

ここで該マトリクスは千鳥形チャネルを含み、そして90%以上の孔隙率を有する、多孔性マトリクス、を含む、デバイス。

【請求項47】 前記マトリクスが、100 μm より大きいサイズを有する一次孔および10 μm 未満のサイズを有する二次孔を含む、請求項46に記載のデバイス。

【請求項48】 前記チャネル内に播種された軟骨細胞をさらに含む、請求項46または47に記載のデバイス。

【請求項49】 少なくとも2つの領域を含む組織操作のための多孔性デバイスを作製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 第1細胞型の接着、増殖、および／または分化を促進するように選択された孔サイズ、孔隙率、マクロアーキテクチャ、ミクロアーキテクチャ、および組成を有する第1領域を、材料の固形自由造形製作により作製する工程、

(b) (i) 第2細胞型の接着、増殖、および／または分化を促進するようにか、または(ii) 該第1細胞型または該第2細胞型のいずれかの接着または増殖を制限するように選択された孔サイズ、孔隙率、マクロアーキテクチャ、ミク

ロアーキテクチャ、および／または組成を有する第2領域を、材料の固形自由造形製作により作製する工程、

を包含し、ここで該第1領域および該第2領域の各々は、層剥離を回避するように適合した孔サイズ、孔隙率、マクロアーキテクチャ、ミクロアーキテクチャ、および／または組成の勾配を有する、方法。

【請求項50】 前記第1領域と前記第2領域との間に、孔サイズ、孔隙率、および／または組成の移行帯または勾配を形成する工程をさらに包含する、請求項49に記載の方法。

【請求項51】 前記固形自由造形製作が三次元プリンティングである、請求項49に記載の方法。

【請求項52】 前記第1領域、前記第2領域、またはその両方を形成する材料が、ポリマー性材料を含む、請求項49～51のいずれかに記載の方法。

【請求項53】 前記領域の一方または両方に、浸出可能な粒子を組み込む工程をさらに包含する、請求項49に記載の方法。

【請求項54】 前記デバイスから前記浸出可能な粒子を浸出させる工程をさらに包含する、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記浸出させる工程の前に、液体二酸化炭素または超臨界二酸化炭素を使用して、残渣溶媒を前記デバイスから取り除く、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 工程(a)および／または工程(b)における前記ポリマー性材料が、ポリマーでコーティングされた非ポリマー性粒子のコアセルベートである、請求項52に記載の方法。

【請求項57】 前記デバイスの1つ以上の領域に、細胞を播種する工程をさらに包含する、請求項49に記載の方法。

【請求項58】 デバイスが少なくとも2つの領域を有し、該領域のうちの1つは骨再生領域であり、そして該領域のうちの1つは軟骨再生領域である、請求項49に記載の方法。

【請求項59】 インビトロで前記軟骨領域に選択的に細胞を播種し、一方で同時に前記骨領域における細胞接着を排除する工程、をさらに包含する、請求

項58に記載の方法。

【請求項60】 前記選択的に播種する工程が、前記2つの領域の相対的な孔隙率の関数として達成される、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 前記細胞が軟骨細胞である、請求項57または59に記載の方法。

【請求項62】 前記固形自由造形製作方法が、ステレオリソグラフィー、選択的レーザー焼結、弾道粒子製造法、および融合堆積モデリングから選択される、請求項49に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般的に、組織再生のための材料、アーキテクチャ、および／または特性の勾配により特徴付けられる移植可能なデバイスに関する。このデバイスは、固形自由造形製作 (solid free-form fabrication) 技術を使用して作製され、この技術は、コンピューター支援設計と組み合わせられ得る。

【0002】**(発明の背景)**

骨の欠乏または欠損は、先天的欠損、疾患、加齢、または外傷から生じ得る。骨は、骨組織と呼ばれる高度に血管化した組織から構成され、これは造血要素である骨髄を保有する。骨の外部構造および内部構造は、動的フラックスにあり；この細胞性要素は、カルシウム塩が堆積した軟骨のマトリクスを生成および再造形する。成熟した骨の約3分の2が、リン酸カルシウム（ヒドロキシアパタイトとして）であり、3分の1は優先的に膠原線維および他のカルシウム塩であるが、わずか2%重量は生存細胞である。カルシウム吸収および堆積のプロセスを通して、骨細胞および種々の他の細胞型は、骨格が身体の構造的支持を提供し続ける間に、必要に応じて骨を再造形または治癒し得る。

【0003】

骨は、高密度領域（緻密）および海綿質領域（格子状）にさらに分けられる。それがより高い機械的強度を有するので、緻密骨は、体重および骨格筋収縮により生成される最高の物理的負荷を受けると位置付けられる。緻密骨は、骨の皮質として知られるものを形成する長骨の長軸の表面に沿って形成する。海綿質骨は、骨の「頭部」（骨端）および内部領域を含み、そしてより大きな骨における骨髄腔に接する。

【0004】

他方で、軟骨は、5～10重量%の生存細胞から構成される無血管性組織である。身体には、3つの主要な型の軟骨が存在する：硝子軟骨、線維軟骨、および

弾性軟骨。硝子軟骨は、骨の骨端を被覆し、そして滑膜性の連結において、流体を満たした被膜内に存在する。線維軟骨は、脊柱の椎骨を分離する椎間円板を構成する。弾性軟骨は、鼻の先端のような極度の弾性を必要とする領域において存在する。軟骨は、軟骨細胞と呼ばれる細胞により形成され、そしてこれを含む。硝子軟骨の細胞外マトリクスは、密接に充填されたⅠ型膠原線維およびプロテオグリカン（コンドロイチン硫酸マトリクス中のヒアルロン酸およびグリコアミノグリカンを含む）を含む。軟骨細胞は、マトリクスを通じた拡散により栄養素を受容し、そして排泄物を処理する。そしてこれは、限られた移動性または損傷を受けた組織を分裂および再生させる能力を有すると考えられる。軟骨細胞は通常、抗新脈管形成因子を産生する。しかし、軟骨の広い領域が損傷を受ける場合には、線維芽細胞による過剰増殖およびこの領域の新生血管形成が、関節軟骨の代わりに、癒痕組織または仮骨の形成を生じ得る。細胞を形成する骨の引き続く内殖は、これらの領域におけるカルシウム堆積を生じ得、これは局所領域のさらなる変形を引き起こす。

【0005】

従って、骨と軟骨との間の界面は、血管化組織と無血管性組織との間、ならびに鉱化（骨化）膠原マトリクスと非鉱化膠原マトリクスとの間の界面である。外傷性傷害、ならびに変形性関節症および加齢のような状態は、しばしば関節軟骨の損傷を生じ、これはまた、根底の骨への損傷を含み得る。従って、両方の組織の型の異なる必要性を満たし、そして同一部位で両方の組織型の修復に向かうための治癒プロセスを可能にするかまたはそれを促進する処置方法について必要性が存在する。

【0006】

生存組織の移植片の臨床的使用は、近年では、新鮮に採取された完全に形成された組織（例えば、皮膚移植片または器官移植）の直接移植から、再生するか、または局所的構造の再生を促進するマトリクス上の細胞の接種に関する戦略へと進展してきた。硬組織を保有する複合体および重量について、少なくとも一部の治癒期間、硬組織の置き換えまたは置換により既存の構造の機械的支持を提供するための、さらなる必要性が存在する。従って、デバイスは、特定の細胞型の移

動、滞留、および増殖を促進し、ならびに治癒の間の機械的および構造的支持を提供する特定のアーキテクチャの足場として作用しなければならない。関節（硝子）軟骨の再生のためのデバイスの場合、残留物質が再生組織の表面完全性（平滑性）および全体的強度および弾性を損ない得るので、デバイスが完全に再吸収可能であることが重要である。

【0007】

細胞接着および増殖を促進するために、デバイスの全体的な多孔性が重要である。さらに、個々の孔の直径またはサイズは、細胞が、デバイス内に移動し、コロニー形成し、そしてその間に分化する能力を決定するにおいて重要な因子である（Martin, RBら、*Biomaterials* 14:341、1993）。骨格組織について、組織の正確な幾何学および形状を再生するように導かれる支持体である骨および軟骨は、重要であると考えられる。約150 μm を超え、そして好ましくはより大きい、孔サイズ（Hulbertら、1970；Klawitter, J. J. 1970；Piecuch、1982；およびDennisら、1992）および50%を超える孔隙率が、骨形成細胞によるキャリアの細胞浸潤のために必要とされることは、一般的に承認される。組織再生足場が、軟骨の形成を促進するために、高度に多孔性（50%より高く、そしてより好ましくは90%より高い）でなければならないことが、さらに認められている。

【0008】

創傷治癒および組織再生の生理学的プロセスが、複数の細胞型で引き続き進行されること、および細胞性因子が役割を果たすことは、十分に実証されている。例えば、血栓は、凝固および血餅溶解の両方を調節するカスケードの構成成分である血液要素により、形成および除去される。最終的に分化されない細胞（例えば、線維芽細胞）は、血栓内に移動し、そして膠原線維を下に配置する。新脈管形成細胞は、循環する前駆体に由来するかまたは細胞から放出される走化性因子によって補充されて、脈管組織を形成する。最終的に、細胞は分化して、特殊化された組織を形成する。治癒プロセスを促進するために、外因性の天然または合成因子を添加することの概念はまた、強力に探求されている分野であり、そして

多数の増殖因子（例えば、サイトカイン、新脈管形成因子、およびトランスフォーミング因子）が、単離、精製、配列決定、およびクローン化されている。1つまたは複数の因子を放出するための正確な順序および濃度を決定することは、組織操作の分野の中で別の研究領域である。

【0009】

移植片または移植可能デバイスにおいて、組織再生の上記のいくつかの問題に取り組むためのいくつかの試みが開示されている。米国特許第5, 270, 300号は、軟骨または骨における欠損または病変を処置するための、マトリクスを提供する方法を開示する。このマトリクスは、可能性としては、細胞集団を可能にするのに十分な大きさの孔を有するコラーゲンから構成されており、そしてさらに、再生されることが所望される型の組織に適切な成長因子または他の因子（例えば、血管新生因子）を含む。米国特許第5, 270, 300号は、特に、軟骨修復細胞の分化を誘導するための、低濃度での増殖因子および走化性因子としての、マトリクス溶液におけるTGF- β の使用、および高濃度での、これらの因子の引き続く放出を教示する。骨および軟骨に隣接する欠損の場合、骨再生マトリクスと軟骨再生マトリクスとの間に膜が固定され、一方の部位から他の部位への血管浸潤を防ぐ。

【0010】

Athanasiouらの米国特許第5, 607, 474号は、2つの生分解性ポリマー性材料を含む成形されたキャリアデバイスを記載している。このポリマー性材料は、本体内に配置されて2つの異なる型の組織を結合する目的で、互いに隣接して配列され、異なる機械的特性を有する。それぞれのポリマー性材料は、組織細胞が侵入しそして接着し得る、可変の大きさの孔隙率または孔サイズを有する。このデバイスの2つの成分は、別々に製作され、そして例えば、型の中で一緒に連結される。細胞接近のためのより多い継代のような他の特徴は、デバイス中に機械的に配置され得る。

【0011】

米国特許第5, 514, 378号は、ポリマーおよび粒子溶液から膜を形成する方法を用いて、非常に多孔性の生体適合性デバイスおよび生分解性デバイスを

提供するいくつかの必要性に取り組むことを試みている。この孔は粒子を除去することにより作製され、ポリマーを溶解しない溶媒（例えば、水）中で溶解することおよびそれらを濾過することにより達成され、これにより多孔性の膜を残す。このポリマーは、非水性の溶媒中に溶解されなければならない、そして合成ポリマーに限定される。一旦、膜が作製されれば、それは所望の形状に鋳造（キャスト）され得る。このような膜がまた一緒に積層され、3次元形状を形成することが想定される。

【0012】

このようなデバイスの形態のみでなく、それらが構成される材料は、再生プロセスならびにデバイスの機械的強度に寄与することがさらに認識されている。例えば、いくつかの材料は骨原性であり、そして骨形成細胞の増殖を刺激する；いくつかの材料は骨伝導性であり、骨形成細胞遊走および組み込みを促進する；そしていくつかは骨誘導性であり、骨芽細胞への間葉幹細胞の分化を誘導する。骨原性であることが見出された材料は、通常、リン酸カルシウムの天然供給源または合成的供給源を含む。骨誘導性材料としては、形質転換成長因子- β （TGF- β ）遺伝子スーパーファミリーのメンバー（形態形成タンパク質（BMP）およびインスリン様成長因子（IGF）を含む）由来の分子が挙げられる。

【0013】

米国特許第5,626,861号は、生分解性ポリマー、生体適合性ポリマーおよび粒子状リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイトから構成される骨移植片またはインプラントとしての使用のための複合性材料を教示する。ポリマー単独よりも機械的強度を増大するため、そして「骨結合する」材料を提供するため、リン酸カルシウムセラミックが添加された。この材料は、100ミクロンと250ミクロンとの間のサイズの不規則な孔を提供する様式で生成される。

【0014】

上記引用された米国特許において記載されるデバイスは、複数のコンポーネントが作製され、そして体内において別々に配置されるかまたは前アセンブルされるかのいずれかであることを必要とする。これは、まず、インプラントの際に複雑な操作を生じ、他の場合には、デバイス成分の間の連結が移植後に分離される

危険性を生じる。

【0015】

さらに、これらのデバイスは、細胞増殖および組織再生を増強する微小環境を作製するマイクロアーキテクチャ (microarchitecture) に加えて領域の内および外で、酸素、栄養物および成長因子の拡散を可能にするマクロアーキテクチャ (macroarchitecture) または全体設計を欠く。

【0016】

従って、選択する細胞接着および増殖を促進する孔サイズおよび孔隙率を有する、このデバイスの規定の領域内の細胞の播種および培養のためのデバイスを提供することにより、これらの欠点を克服することが本発明の目的である。

【0017】

移植後の機械的支持および統合性を提供し得るデバイスを提供することが本発明のさらなる目的である。

【0018】

完全に生分解性であるこのようなデバイスを提供することが本発明のなおさらなる目的である。

【0019】

(発明の要旨)

本明細書において開示されるデバイスは、以下の1つ以上の勾配を有する複合型移植可能デバイスである：材料、マクロアーキテクチャ、マイクロアーキテクチャ、または機械的特性（移植の前および／または後にデバイス上、およびデバイス中の特異的細胞型の接着を選択または促進するために用いられ得る）。種々の実施態様において、これらの勾配は、材料から構成され、または材料から構成される領域に対する組織の1つの型に最も適合する特性を有する、もしくは異なる型の組織に適合する特性を有する、領域からデバイスにおいて移行帯を形成する。

【0020】

このデバイスは、構造的統合性およびアーキテクチャにおける材料の特有の変

化を与える連続的なプロセスにおいて作製される。この勾配は、デバイスの材料、ミクロアーキテクチャ、マクロアーキテクチャ、機械的特性、またはこれらを総合したいくつかと関連し得る。本明細書において開示されるデバイスは、代表的に固形自由造形プロセス (solid free form process)、特に3次元プリンティングプロセス (three-dimensional printing process) (3DPTM) を用いて作製される。他の型の固形自由造形製作 (SFF) 法は、ステレオリソグラフィー (SLA)、選択的レーザー焼結 (SLS)、弾道粒子製造法 (ballistic particle manufacturing: BMP)、および融合堆積モデリング (fusion deposition modeling: FDM) を含む。このデバイスは、単一の連続プロセスにおいて製造され得る。これにより、組織再生足場の1つの形態および組織再生足場の他の形態からの移行部は、一旦、このデバイスが生理学的液体に移植されれば、「継ぎ目 (seam)」を有せず、軸にそって異なる膨張に供されない。

【0021】

骨の修復または置換のための1つの実施態様において、合成生体適合性ポリマーである材料 (例えば、ポリ (α) エステル) (特に、細胞の接着および制御された生分解に十分適合されている) に対して、骨原性材料および骨伝導性材料 (例えばリン酸カルシウム) のある勾配が形成される。別の実施態様において、このデバイスは、ミクロアーキテクチャ中に勾配を有する。マクロアーキテクチャ、すなわち全体的形状は、1つの領域を通じておよび／または囲んで液体が流れることを可能にする設計および1つの形状から他への勾配を伴う別の領域における異なる形状であり得る。別の実施態様において、マクロアーキテクチャは、内部連通した孔の骨誘導性系から軟骨細胞コロニー化を誘導する千鳥形チャンネルの系までであり得る。別の局面において、この勾配は、張力または圧縮強度のような機械的特性に関し得る。特性の勾配は、重量負荷に適切である特性から軟部組織再生に適切である特性までであり得る。

【0022】

別の実施態様において、組織を形成する細胞の成長または分化を選択的に増強

または強化する成長因子のような物質が、デバイス上に、またはデバイス中に組み込まれ得る。デバイスを製作する特に好ましい方法は、デバイスの構造中に因子を組み込む工程を含む。

【0023】

(発明の詳細な説明)

従来と異なるマイクロアーキテクチャおよびマクロアーキテクチャを有する3次元デバイスが開発された。これは、直ちに播種されそして移植され得、体内への配置の前に体外系に播種され得、または隣接する組織からの内殖により移植されそして播種され／または定着され得る。このデバイスは、2つの型の支持組織の間の生理学的接合部で、複合アロプラストの構築、または組織再生のために設計された部分的同種移植片に適用される場合、利点を有する。例えば、本明細書に記載のように製造されたデバイス（骨および軟骨の複合体の作製において使用するために設計される勾配ゾーンまたは移行帯を含む）は、このデバイスの全体的特性に起因する、ポリマー性材料の異なる膨張または他の特性（例えば、体内の液体充填腔、または他の液体含有部位中の乾燥材料の吸湿性、もしくはその配置により生成される浸透圧）により生じる軟骨部分からの骨部分の層剥離を受けにくい。

【0024】

(I. デバイス)

(A. デバイス構造)

このデバイスは、細胞の接着、増殖、および／または分化を、特定の目的のために必要とされるように、最大にするために構築される。以下の変数を操作して、所望の効果を達成し得る：マクロアーキテクチャ、化学組成、有孔性を含むマイクロアーキテクチャ、孔サイズ（直径）、界面活性剤および細胞接着ペプチドのような表面改変、生理活性剤の取り込み、流動特性（すなわち、デバイスを通る、またはデバイス内の流体の流動を指向および制御するチャンネル）、ならびにデバイス上もしくはデバイス内の構造要素。プリンティングパラメーターおよび出力特性の操作は、マクロアーキテクチャ、マイクロアーキテクチャ、ならびに内部特性および表面特性の、設計および製作を可能にする。「マクロアーキテクチャ

」は、デバイスの全体の形状を意味するために本明細書中で用いられる。これは、ミリメートルからセンチメートルのオーダーの寸法であり、かつ規定された形状を有する。用語「マイクロアーキテクチャ特性」は、予想され、そしてデバイス内に形成される、内部構造を意味するために本明細書中で用いられる。微細特性（例えば、蛇行状の相互接続された孔および表面プリンティング）は、材料、プロセッシング、および仕上げの特性であるが、設計によって、または三次元プリンティングプロセスによって配置される必要はない。

【0025】

本明細書中に開示されるデバイスは、単一の部品として作製される複合体である。このデバイスは、身体に配置される場合にわずかに圧縮するが、維持されるべきデバイス内外の液体の移動のための構造的特性を許容する、全体的形状を有する。これは、チャンネルおよび孔を有し、組織の2つの型の間の界面での身体内の移植に適切である。1つのタンパク質（例えば、本明細書中に記載される複合体デバイスの骨領域）は、いくつかの機能に取り組むために特異的に設計される。これらの1つは、デバイスの周囲でありかつデバイスを通じて、血液および髄到達（*bourne*）組織形成要素の移動を促進するためのものであり、表面積対体積比を最大にして骨内殖を促進し、かつ圧縮およびねじれ強度を最大にし、移植の力に耐えるために必要とされる機械的保全性を提供する。デバイスの保全性の犠牲を伴わない材料の最小化は、作製に必要とされる物品の費用を削減するため、ならびに免疫応答を潜在的に引き起こし得え、そして分解副生成物を放出する身体への外来物質の導入を最小にするために、いつでも可能であることが望ましいと考えられる。

【0026】

このデバイスの全体の形状は、このデバイスが、デバイスを通じておよびデバイスの周囲で、生物学的もしくは生体適合性の流体中に溶解された栄養素の連続した流動を可能し、従って、気体、流体、または温度勾配によって形成される、デバイスを横切る圧力の差異（*pressure differential*）の可能性を最小にするように機能するものである。このデバイスは、細胞の遊走、接着、増殖および分化を伝導する、ジオメトリー、孔、および液体伝達チャネ

ルを備える。これらの特性を操作して、細胞接着および別の増殖を促進する一方、異なる細胞型を有するデバイスの特定の領域を選択的に占め得るか、または1つの領域に内殖させ得る。この方法において、このデバイスは、例えば、骨液界面での長骨の軟骨被覆表面に特有である、複合体支持組織界面の再生を促進し得る。本実施例によって実証されるように、これらのデバイスを操作して、骨形成細胞および軟骨細胞の両方の増殖を可能にしかつ促進し得る。これらの両方は、天然に存在する軟骨-骨界面の一部である。

【0027】

壁に連結され、かつ規定された幅、長さ、および方向の実質的に直線の通路から構成される、チャンネルは、本明細書中に記載されるデバイスのマイクロアーキテクチャーの特性である。千鳥形 (Staggered) チャンネル (これは、デバイスを介して延び、かつこのデバイスの異なる層において90°にオフセットされる) は、1つの特に好ましい実施態様である。チャンネルおよび壁を千鳥形にすることは、チャンネルを通じるまっすぐな設計と比較してデバイスの強度を増す。チャンネルの幅は、約150ミクロンから500ミクロン (好ましくは、250ミクロンを有する) の範囲であり、構造的強度または組織形成の均一性を含まずに、細胞を播種するために利用可能である、表面積を最大にし得る。

【0028】

さらに、このチャンネルは、細胞に対する栄養素の輸送、ならびに細胞副生成物およびポリマー分解副生成物 (これらは全て、デバイスが身体における移植の前であろうと、後であろうと細胞によりコロニー化される場合に生じ得る) の除去を容易にする。固有の巨視的な千鳥形チャンネルを設計して、軟骨細胞が、皮層的にではなく、デバイスの厚みを通してデバイスと接触することを可能にする。このことは、軟骨細胞の制限された遊走能力のために重要であり; この細胞型の遊走距離は、約2mm未満である。従って、このデバイスが、体外に播種される場合、軟骨細胞は、このデバイスの中央に、直接配置され得る。

【0029】

デバイスの孔隙率は、コロニー化細胞に対する栄養素の流動、および細胞接着に利用可能な表面積を制御する。研究は、60ミクロン以上の最小の直径の孔が

、高度に血管化された組織（例えば、骨）における脈管形成のために必要であることを示した。粉末または合成ポリマー、あるいはポリマーおよび無機粒子から製作されるデバイスの有孔性が、材料へ「犠牲の」材料（例えば塩化ナトリウム）を取込むことによって操作され得ることは、当該分野においてすでに公知である。米国特許第5,514,378号は、生体適合性ポリマー溶液中に塩粒子を分散させ、ポリマー溶媒を蒸発させて、そして多孔性膜を作製するために形成された複合体から塩を浸出させる方法を教示する。

【0030】

このデバイスは、代表的には、合成ポリマー性材料を使用して形成される。このデバイスは、再吸収可能物質および／または非再吸収可能物質を含み得る。これは、製造プロセスの間、デバイスのさまざまな部分に配置さ得る。関節または他の軟骨-骨複合体を交換するためのデバイスについて、1つの領域を形成している材料は、好ましくは骨誘導性であり、そして異なる隣接部位を形成するそれらの物質は、好ましくは、軟骨細胞の成長および成熟に対して許容的である。生理活性物質（例えば、成長因子）を、デバイス上またはデバイス内に取り込み、特定の細胞型の成長、分化、または増殖のために選択し得る。

【0031】

デバイスにおける挿入物を用いて、また、細胞の接着、増殖および／または分化をまた操作し得る。例えば、軟骨治癒および再生を支持するように設計した第1の部分を含む挿入物、および骨再生を係留しかつ支持するように設計した第2の部分は、骨軟骨性欠損を処置することにおいて使用するために、デバイスに組み込まれ得る。この例（以下で更に詳細に記載されている）において、このデバイスは、3つの領域（意図、設計および組成において異なる）が存在する、単一の部分として、連続したプロセスにおいて製作される：1）軟骨部分、2）骨部分、そして3）軟骨部分および骨部分の両方に隣接しかつ連結する移行帯。軟骨部分は、直径約250ミクロンの、千鳥形のマクロチャネルを含む合成ポリエステルポリマーから構成される約90%の多孔質である。骨部分は、25～55%の多孔性であり、そしてデバイスの外側の縁での流体および気体の流動を許容するが、宿主細胞との接触を維持する形状において、合成ポリマーおよび骨誘導

性材料の両方から一般に構成される。

【0032】

移行帯（これは、軟骨部分および骨部分の両方に隣接する）は、骨もしくはより高い密度部分の有孔性に近い有孔性から、軟骨または最低密度部分に近い有孔性までの有孔性の勾配を形成する。移行帯はまた、骨部分の組成から、軟骨部分の組成までのポリマー組成の勾配を形成し得、ここで、このポリマーは、コポリマーであり、そしてモノマーの割合は、骨部分対軟骨部分について異なるか、あるいはこの部分は、2つの異なるポリマーから形成され、そして移行帯は、2つのポリマーのブレンドまたはコポリマーである。この移行帯はまた、急な勾配を含み得るか、あるいは骨部分付近の骨部分のような外部形状を有する領域および軟骨部分に最も近い領域の軟骨部分に対して、実質的に円形であるか、またはその軟骨部分に類似する外部形状を有する領域を有し得る。

【0033】

表面仕上げは、用いられる材料および形成パラメーターの物理的造作によって管理される。これらの要素としては、粒子サイズ、粉末充填、粒子およびプリンティングバインダーの表面特性（すなわち、接触角度）、バインダージェット（*binder jet*）の放出速度、バインダー飽和、層の高さ、ならびに裏打ちが挙げられる。粉末表面を有するバインダー液体の相互作用は、特に、表面の粗さを最小にするように、注意深く制御され得る。このバインダーが広い面積において失敗した場合、造作サイズの制御は、困難であり得、結果として粗い表面になる。

【0034】

（B. デバイス組成）

このデバイスは、細胞接着を促進する固有の能力を有する、天然構造物質または合成構造物質（例えば、リン酸カルシウム）を用いて製造され、そして引張り強度および圧縮性に関する機械的安全性を提供する。この物質は、特定の粒子サイズにした粉末、粉末の拡散物、および溶媒との結合物を生成するために、製粉および裏ごしを受けやすくなければならない。遊離の粉末は、製作後にデバイスから取り除かれなければならない。

【0035】

(粒子サイズ)

粉末ベッドにおいて使用される材料は、天然でない場合、またはさもなくば実質的に均質な粒子として利用可能である場合、そのようなものを達成するために加工されなければならない。使用される合成ポリマー生成物は、例えば、液体窒素を用いる超遠心ミル（モデルZM100；Glen Mills, Clifton, NJ）を使用して、低温粉碎に供される。モデルA20（Janke and Kunkel GmbH, Germany）のようなミルを使用する分析的粉碎は、別の好ましい技術である。一度粉碎された粉末は真空乾燥される。

【0036】

粉碎された材料のふるい分けが行われ、最小および最大の均一のサイズの粒子が産生される。従って、最大の粒子サイズはまた、使用されるふるいの関数である。約30ミクロンメッシュのふるいが一般的であり、そしてより大きなメッシュの他のふるいもまた、満足な結果で使用され得る。ふるいは、振動するふるい振盪機（sifter-shaker）（モデルAS200、Retcsch, Haan, Germany）上に重ねられ得る。他のサイズは、以下の実施例に記載される。

【0037】

(ポリマー)

本明細書中に記載されるデバイスの製造において使用される好ましい材料は、生体適合性であり、数週間以上の間生体再吸収可能であり、そして一般的に細胞接着を促進する。用語「生体再吸収可能」とは、本明細書中では、その材料が成分に分解され、その成分は身体によって再吸収され得、そしてさらに生物分解可能であり得ることを意味するために使用される。生物分解可能材料は、酵素的切断のような能動的な生物学的プロセスによって分解され得る。本明細書中に記載されるデバイスの製造において使用される材料について所望される他の特性には、（1）一般的に受容される安全レベルまで取り除かれ得る生物学的に受容可能な溶媒中での可溶性、（2）150ミクロン未満の粒子にまで粉碎される能力、ならびに（3）弾性ならびに圧縮および引張り強度が含まれる。

【0038】

本発明の使用に特に適することが見出されている合成ポリマーには、ポリ (α) エステル、例えば：ポリ (乳酸) (PLA) およびポリ (DL-乳酸-コグリコール酸) (PLGA) が含まれる。他の適切な材料には、ポリ (ϵ -カプロラクトン) (PCL)、ポリ酸無水物、ポリアリーレート (polyarylate)、およびポリホスファゼン (polyphosphazene) が含まれる。適切である天然のポリマーには、ポリサッカリド (例えば、セルロース、デキストラン、キチン、キトサン、グリコサミノグリカン) ; ヒアルロン酸またはエステル、コンドロイチン硫酸、およびヘパリン ; ならびに、天然または合成タンパク質またはプロテノイド (例えば、エラスチン、コラーゲン、アガロース、アルギン酸カルシウム、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、ゼラチン、アルブミン、カゼイン、シルクプロテイン、プロテオグリカン、プロラスチン (Prolastin)、プロネクチン (Pronectin)、またはベータシルク (BetaSilk)) が含まれる。ポリマーの任意の組み合わせの混合物もまた、使用され得る。好ましい合成ポリマーには、ポリ (ヒドロキシアルカノエート)、ポリジオキサノン、ポリアミノ酸、ポリ (γ -グルタミン酸)、ポリ (ビニル酢酸)、ポリ (ビニルアルコール)、ポリ (エチレン-イミン)、ポリ (オルトエステル)、ポリホスホエステル (polyphosphoesters)、ポリ (チロシン-カーボネート)、ポリ (エチレングリコール)、ポリ (トリメチレン-カーボネート)、ポリイミノ-カーボネート、ポリ (オキシエチレン-ポリオキシプロピレン)、ポリ (α -ヒドロキシーカルボン酸/ポリオキシアルキレン)、ポリアセタール、ポリ (プロピレンフマレート)、およびカルボキシメチルセルロースが含まれる。

【0039】

ポリ乳酸/ポリグリコール酸 (PLA/PLGA) ポリマーを使用する利点には、臨床経験および受容性ならびに加工の容易さが挙げられる。欠点は、分解の間の酸性分解生成物の生成である。しかし、酸性分解生成物の除去の提供は、生成される他のデバイスまたは組織治癒もしくは再生の間に固有に産生される、天然に生成される毒素とともに、デバイス設計によって取り扱われ得る。PLGA

75:25は、体内で迅速に分解する(4~5ヶ月)が、D, L-PLGA 50:50(1~2ヶ月)ほど迅速ではない。他方、より遅く分解する特性を有する他のポリマーは、PLGAとブレンドして、より長い時間の間、いくつかの物理的特性を維持し得るデバイスを作製し得る。

【0040】

骨伝導性材料には、セラミックス(例えば、ヒドロキシアパタイト(HA))、リン酸三カルシウム(TCP)、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、アルミナ、生物活性ガラス、およびガラスセラミックス)、動物由来構造タンパク質(例えば、ウシコラーゲン)、ヒトの死体の骨から加工された鉱物質除去された骨マトリクスが含まれる。市販されている材料には、ProOsteon 500 (Interpore International)、BoneSource (Orthofix) およびOSTEOSET (Wright Medical Technology)、Grafton Gel、Flex、およびPutty (Osteotech)、およびCollagraft (Zimmer)が含まれる。

【0041】

ベンジルアルコールまたはエチルアルコールのヒアルロン酸エステルは、軟骨または血管足場物質のいずれかとしての使用のための適切な機械的および分解特性を有し、そしてほとんど分解生成物を放出しない。ヒアルロン酸は、発生組織において高濃度で存在し、そしていくつかの潜在的な利点を生物学的に付与し得る。ヒアルロン酸エステル粉末生成は、低温粉碎またはコアセルベーションの技術によって可能であるはずである。ポリエチレンオキサイド(PEO)は、広範な分子量において利用可能であり、そしてポリエステルおよびヒアルロン酸エステルの分解特性を改変するためのブレンド剤として使用され得る。

【0042】

塩化ナトリウムまたはリン酸三カルシウムのような無機粒子は、粉末ベッドにおけるポリマー性粒子とともに混合され得る。

【0043】

(ポリマー溶媒)

使用されるプリンティング溶液は、ポリマーについての溶媒であり得るか、またはバインダーを含み、そして1つ以上の溶解されたさらなるポリマーまたは成分に組み込まれることが所望される他の材料を含み得る。好ましい溶媒は、水、クロロホルム、アセトン、およびエタノールである。

【0044】

バインダーは、ポリマーおよび／または生物活性剤あるいはポリマー性粒子を結合する接着剤についての溶媒であり得る。生物腐食性ポリマーの大部分についての溶媒は公知であり、例えば、クロロホルムまたは他の有機溶媒である。タンパク質およびポリサッカリドポリマーのための有機溶媒または水性溶媒もまた公知であるが、タンパク質の変性を避けることが必要である場合、水性溶液が好ましい。しかし、いくつかの場合、結合は、タンパク質の変性によって最も良好に達成される。バインダーは、従来の粉末加工法において使用されるのと同じ材料であり得るか、またはプリンティング後の粉末ベッド中で起こる化学的または物理的变化（例えば、加熱、光重合、化学的架橋、または触媒作用の結果として）を通して、究極的には同一のバインダーを産生するように設計され得る。

【0045】

（補助材料または生物活性剤の取り込み）

表面化学修飾剤または生物学的因子もしくは増殖因子は、デバイス上またはデバイス中に配置され得、これは、デバイスの領域における細胞接着、増殖、成熟、および分化を刺激する目的のために、生理学的環境中に放出可能であり得る。生体適合性溶媒中に直接的に溶解され得るこれらの生物活性剤が高度に好ましい。例は、一般的にタンパク質およびペプチド、ポリサッカリド、核酸、脂質、ならびに非タンパク質有機化合物および無機化合物を含み、具体的に他に言及しない限り、本明細書中では「生物活性剤」といわれる。これらの物質は生物学的効果を有し、たとえば、増殖因子、分化因子、ステロイドホルモン、サイトカイン、リンホカイン、抗体、および新脈管形成の促進因子または阻害因子を有する。

【0046】

生物活性剤はまた、主に構造的な役割を有する化合物（例えば、骨再生についてのマトリクス中のヒドロキシアパタイト結晶）を含む。この粒子は、マトリク

スを作るために使用されるポリマー性粒子の粒子サイズよりも大きいサイズまたは小さいサイズを有し得る。

【0047】

空気、放射線不透性物質（例えば、バリウム）、またはエキソビポでデバイスをモニタリングする目的のための他の画像化剤のような生物学的効果を及ぼさない物質を取り込むこともまた、可能である、

細胞接着を促進するために、細胞接着因子（例えば、ラミニン、プロネクチン、またはフィブロネクチン、あるいはそれらのフラグメント（例えば、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸））がデバイス上でコーティングされ得るか、またはデバイスに結合され得る。そのデバイスはまた、コーティングされ得るか、または、サイトカインまたは他の放出可能な細胞刺激因子（例えば、塩基性線維芽細胞細胞増殖因子（bFGF）、トランスホーミング増殖因子 β （TGF- β ）、神経増殖因子（NGF）、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）、成長ホルモン（GH）、増殖刺激活性（MSA）、軟骨由来因子（CDF）、骨形態形成タンパク質（BMP）または他の骨形成因子、抗血管形成因子（アンジオスタチン））を取り込み得た。

【0048】

さらに、遺伝子を含む、外部から添加された細胞または外部から添加された因子のいずれかが、体内へのその配置の前後で移植片に付加され得る。このような細胞は、患者の組織に由来する自家移植された細胞を含み、そして（必要に応じて）再導入される前の時間の間エキソビポで培養することによって数が拡大された。軟骨組織が収集され得、そして細胞がそこから脱凝集され、そして培養されて、デバイスに播種するために新規な軟骨細胞の供給源を提供し得る。このデバイスにまた、エキソビポで細胞を播種し得、そしてそこに接着する生細胞を体内に配置し得る。

【0049】

上記に言及した増殖因子または他の補助因子をコードする遺伝子配列、またはその部分のDNAはまた、体内への配置の前後でデバイスに取り込まれるか、またはデバイスに添加され得る。そのDNA配列は、「裸」にされ得るか、または

ベクター中に存在し得るか、あるいは別の場合ではカプセル化されるかまたは保護され得る。そのDNA配列はまた、遺伝子のアンチセンス配列またはその部分を表し得る。

【0050】

デバイスに取り込まれ得る生物活性剤には本質的に制限は存在しない。スプレー乾燥、霧化、粉碎、または他の標準的な方法論を使用して粒子に加工し得る材料、あるいは乳剤、微粒子、リポソーム、もしくは他の小さな粒子に形成され得、そしてポリマー性マトリクスにおいて化学的に安定なままであり、そして生物学的活性を保持する材料が、好ましい。

【0051】

(C. デバイスを製造する方法)

このデバイスを製造するための好ましい方法は、固形自由造形製作 (solid free-form fabrication) (SFF) である。SFF法は、プリント材料の組成を変化させることによって、増強面 (build plane) 内の組成を選択的に制御するために使用され得る。SFF法は、種々のポリマー性材料、無機材料および複合材料での使用に採用され、キャド (CAD) を使用して、規定の組成、強度および密度を有する構造を作製し得る。これは、非通常のマイクロアーキテクチャ (例えば、複雑な多孔網または異常な組成勾配を有する、マイクロアーキテクチャ) が、CAD端末で設計され得、そしてSFFプロセス (例えば、3DP) を介して形成され得ることを意味する。

【0052】

(三次元プリンティング)

3DPは、粉末を延展し、そして粉末ベッド上にバインダーを沈着させるプロセスを使用する。三次元プリンティングは、Sachsら、「CAD-Casting: Direct Fabrication of Ceramic Shells and Cores by Three-dimensional Printing: Manufacturing Review 5 (2)、117-126 (1992) および米国特許第5,204,055号 (これらの教示は、本明細書中に参考として援用される) によって記載される。適切な装置と

しては、連続ジェット流 (continuous jet stream) プリントヘッドおよびドロップオンデマンド (drop-on-demand) (DOD) プリントヘッドを有する両方の装置が挙げられる。3DPは、Cimaらに対する米国特許第5,400,962号および同第5,518,680号(これらの教示は、本明細書中に参考として援用される)に教示されるように、医療デバイスとしての使用のための多孔性の生物侵食性 (bioerodible) マトリクスを作製するために使用され得る。

【0053】

連続ジェットヘッドは、小さいオリフィスを通して圧力推進される流体を提供する。液滴は、自然に、その流体の特性およびオリフィスの直径の関数である、ある周波数に落ち着く。複数のジェットヘッドが好ましい。DODプリントヘッドは、1.2kHzまでの周波数で実行する個々のソレノイドバルブを利用する。流体は、これらのバルブを通して圧力推進され、そして小さいオリフィスが、バルブの下流に存在し、正確かつ繰り返し可能な液滴サイズを確実にする。

【0054】

ラスター装置およびベクトル装置の両方が使用され得る。DODを使用する場合、ラスター装置は、プリントヘッドが、ジェットを始動および停止させてそのベッドにわたって後退および前進することを提供する。連続ジェットヘッドは、常時オンであり、そしてベクトル装置を、x-yプリンターと同様に使用する。3DPを使用して、図1に示されるように、粉末または微粒子の連続的に沈着されたベッドの選択された領域上に、バインダーをインクジェットプリントすることによって、固形対象物を作製する(以下により詳細に議論される)。以下の記載において、用語「粉末」および「微粒子」は、交換可能に使用される。各層は、粉末ベッドの表面にわたって粉末の薄層を延展することによって作製される。好ましい実施形態において、可動型粉末ピストンを、シリンダー内に位置付け、このシリンダーは、粉末フィーダー機構に隣接して位置付けられる受取台に、分配された粉末を送達するための粉末化ローラーを有する。

【0055】

このフィーダーピストンは、粉末送達の各インクリメントについての予め決定

された量を上昇させる。次いで、このローラーは、粉末フィーダーシリンダーの表面を横切って掃引し、そしてその粉末フィーダーに直ぐ隣接する受取台を横切って薄層として粉末を沈着させる。次いで、この粉末フィーダーピストンを、ローラーがそのホームポジションに戻されるように降下させて、粉末のいかなる逆送達も防止する。この粉末ピストンおよびシリンダーの配置はまた、一般的なハウジング中に位置される複数のピストン／シリンダーから構成され得、これは、以下の順で複数の粉末を分配するために使用され得る：

1. ローリング／送達機構を有する第1の所望の粉末シリンダーを配置する；
2. 位置可動型ピストンをインクリメント量の粉末を送達するように、インクリメント分上昇させる；
3. ローラーを作動し、粉末を受取台に移動させる；
4. 粉末ピストン駆動機構を降下させる；
5. 粉末フィーダーハウジングを側方にスライドさせて、次の所望の粉末シリンダーを送達機構に整列させる；
6. 工程2、3、4および5を繰り返す；そして
7. 必要とされる多くの異なる粉末および／または粉末層について継続する。

【0056】

この粉末供給の方法は、手動的に制御され得るか、または完全に自動化され得る。異なる粉末の相互混入は、各粉末が、その各自の別々のシリンダー内に含まれるので最小化される。この方法の利点の1つは、粉末シリンダーの数にかかわらず、ただ1つのピストン上昇／降下機構のみが操作に必要とされることである。送達のための粉末を上から落下するよりむしろ上昇させることによって、重力に基づく送達システム（例えば、「ラットホーリング（ratholing）」、不完全な供給スクリュウの充填／空化（emptying）、および微細粉末の使用を伴う「ダスティング（dusting）」）に関連する問題は、十分量のエネルギーだけを導入して、インクリメント量まで粉末を移動するので、排除または最小化される。この複数のシリンダーおよびピストンを有する、粉末フィーダーハウジングはまた、取り外し可能なアセンブリとして設計され得、ある粉末システムから別の粉末システムへの転換時間を最小化する。

【0057】

粉末ベッドは、各層の粉末の延展およびプリンティングの際に下降するピストンによって支持される（または、反対に、インクジェットおよびスプレッダーを、各層のプリンティング後に上昇させ、そしてベッドを静止させたままにする）。各層についての命令は、その成分のキャド（CAD）表示から直接的に誘導される。プリントされるべき領域は、所望の平面と対象物のCAD表示との間の交差点の面積を計算することによって得られる。個々のスライスされたセグメントまたは層を連結して、三次元構造を形成する。結合されない粉末は、その構造が形成される場合に、その成分の無関係な部分を一時的に支持するが、プリンティングの完了後に除去される。

【0058】

3DPプロセスを、図1に模式的に示す。ここで、3DP装置は、一般的に番号10によって示される。粉末12を、粉末スプレッダー14によって段階1の供給源（示さず）から、形成ベッド18の表面16上にロールする。この延展された層の厚さは、生成される投薬形態の型の機能により変化される。一般的に、層の厚さは、約100～約500ミクロン、そしてより代表的には、100～約200ミクロンの間で変化し得る。次いで、プリントヘッド22は、この粉末層上にバインダー（液体）24を沈着し、そして形成ピストン26を、1つの層の距離分降下させる。粉末を再度この形成ベッド18上にロールし、そしてこのプロセスを、投薬形態が完成するまで繰り返す（図1の段階2および3）。液体の液滴サイズは、直径約50～約500ミクロンであり、そしてより代表的には、80ミクロンより大きい。サーボモーター（示さず）を使用して、この装置10の種々の作動を駆動する。

【0059】

3DP部品の構築は、粉末ベッド上に個々のバインダーの液滴をプリンティングすることから生じる構造要素の、相互編成として表され得る。これらのエレメントは、マイクロ構造基本単位（microstructural primitive）と呼ばれる。この基本単位の寸法は、このマイクロ構造が変化され得る長さの規模を決定する。従って、生物活性剤の濃度が変化され得る最小の領域は、

個々の液滴基本単位の寸法に近い寸法を有する。液滴基本単位は、粉末ベッド中の単一のラインに沿った、液滴の連続的プリンティングによって形成されるライン基本単位の幅に非常に近い寸法を有する。ライン基本単位の寸法は、粉末粒子の寸法および単位ライン長あたりにプリンティングされるバインダーの量に依存する。1. 1cc/分の塩化メチレンのインクジェット沈着が、45~75ミクロンの粒子サイズを有するポリカプロラクトン（PCL）粉末ベッドの表面にわたって8"/秒でラスタライズするように行われる場合、500ミクロン幅のライン基本単位が生成される。より高いプリントヘッド速度およびより小さな粒子サイズが、微細なラインを生成する。この基本単位の寸法は、液体バインダーまたは溶媒が、この基本単位を形成する粉末中の領域の孔を充填するために必要とされるという仮定に基づき計算された規模を有する規模のようである。

【0060】

より微細な造作サイズもまた、純粋な溶媒よりむしろポリマー溶液をプリンティングすることによって達成される。例えば、クロロホルム中10重量%のPCL溶液は、上記と同じ条件下で200ミクロンのラインを生成する。より高い溶液粘度は、基本単位の中心から離れた溶媒の移動を遅くさせる。

【0061】

この層は、各層が層化されるにつれて、硬化するか、または少なくとも部分的に硬化される。一旦、所望の最終的な立体構造が達成され、そして層化プロセスが完了すると、その形態およびその内容物が、粉末粒子の結合をさらに促進するために選択された温度で、過熱または硬化されることが、いくつかの適用において所望され得る。生体適合性の材料から構築された移植可能なデバイスのためのマトリクスの場合、さらなる硬化が必要とされるか否かに関わらず、緩い未結合の粉末粒子が、最終的なデバイスを残すために、適切な技術（例えば、超音波洗浄）を使用して除去されてもよく、されなくてもよい。

【0062】

溶媒乾燥速度は、3DPによるポリマー部分の生成において重要な変数である。溶媒の非常に迅速な乾燥は、プリンティングされる成分のゆがみ（warping）を引き起こす傾向がある。必ずしも全てではないが、多くのゆがみは、低

い蒸気圧を有する溶媒を選択することによって排除され得る。従って、クロロホルムをプリンティングすることによって調製されるポリカプロラクトン（PCL）部分は、ほとんど検出可能でない量のゆがみを有するが、塩化メチレンで作製された多くの部分は、有意なゆがみを示す。最小のゆがみおよび粒子間の適切な結合を達成するために、溶媒を組み合わせることがしばしば簡便である。従って、活発な溶媒は、より低い蒸気圧を有する溶媒を少ない割合で混合され得る。

【0063】

有意な量の物質は、インクジェットプリントヘッドを介する固形分散剤または固形前駆物質をプリンティングすることによって、100ミクロンスケールで成分の選択的領域中に沈着され得る。数百のジェットが、このプロセスに組み込まれ得る。多くの個々に制御されたジェットが、より高速の3DP構築を可能にする。

【0064】

3DPは、ポリマー性粒子または粉末の使用を必要とする。この作業生成物の最小最終造作寸法は、使用される粉末材料の最初の粒子サイズに依存する。すなわち、少なくとも2つの粒子にてそこに一滴の溶媒をプリンティングすることによる結合のプロセスは、最小造作サイズが、その粒子サイズの約2倍であることを意味する。攻撃的な溶媒（aggressive solvent）は、粒子をほぼ溶解し、そして乾燥の際に高密度ポリマーを再沈殿させる傾向がある。乾燥のための時間は、溶媒の蒸気圧によって主に決定される。それを超えると、そのポリマーが非常に可溶性になる1つの極値（例えば、30重量%の可溶性）からの範囲が存在し、これは、このポリマーが、より低い可溶性と比較して、1つの層をプリンティングするに必要な時間の間、非常に迅速に溶解することを可能にする。粒子が接着される程度は、溶媒中のポリマーの粒子サイズおよび可溶性に依存する。微細な粉末は、より大きな粒子サイズを有する粉末よりも、迅速に溶解する。さらに、比較的大きな粒子は、溶媒バインダーをエバポレートする前に、完全には溶解され得ない。

【0065】

本明細書中に記載される好ましい実施態様において、このデバイスは、勾配ま

たはそれ自体が勾配であり得る移行帯のいずれかを含む。この勾配は、材料または材料混合物の勾配であり得る。材料の勾配を使用することは、得られた構造の物理的特性が徐々に変化することを可能にし、それにより、このデバイスの破壊またはこのデバイスによる実行の失敗を導き得る大きな不連続面を緩和する。この材料のこのような物理的特性としては、熱膨張係数、弾性および膨潤性が挙げられる。

【0066】

生物活性剤のデバイスへの組み込みのための2つの主要な方法が存在する：ポリマー性マトリクス内での分散として、および不連続のポリマー性マトリクス内の不連続単位として。第1の方法において、この生物活性剤は、好ましくは、ポリマー性粒子バインダーにおいて適用される；第2の方法において、この生物活性剤は、ポリマー性粒子について非溶媒において適用される。

【0067】

生物活性剤のための溶媒の選択は、所望の放出態様および溶媒における生物活性剤の適合性に依存する。この溶媒は、マトリクスを溶解するように選択されるか、またはこの生物活性剤に沿って堆積される第2のポリマーを含むように選択されるかのいずれかである。第1の場合において、プリンティングした液滴は、ポリマー粉末を局所的に溶解し、そしてエバポレートを開始する。この生物活性剤は、エバポレーションの後に、ポリマー粉末中に効果的に堆積される。なぜなら、この溶解したポリマーは、この薬剤に沿って堆積されるからである。後者の場合（薬物およびポリマーの両方が、プリンティングされた溶液中に溶解される場合）は、粉末層がこの溶媒中に可溶性ではない場合に有用である。結合は、この粉末粒子の間のネックでのバインダー（この場合ポリマー）の堆積によって達成され、その結果、それらは、この生物活性剤に沿ってともに効率的に結合される。

【0068】

デバイスは、このデバイス内の生物活性に富む領域とともに製作され得る。この場合において、複数のプリントヘッド（*print head*）が使用されて、粉末ベッドの選択された領域において溶媒を含有する堆積物が活性化される。所

望のデバイスの残りの体積は、別々のプリントヘッドによって堆積される純粋な溶媒と結合される。このデバイスはまた単純に、生物活性剤でコーティングされ得るか、またはその中もしくはその上に配置される薬剤を有し得る。生物活性剤は、このデバイスに、共有結合されてもよく、非共有結合されてもよい。

【0069】

(他のSFF方法)

固形自由造形製作 (solid free-form fabrication: SFF) 方法の他のタイプは、本明細書中に記載のデバイスを作製するために適合され得る。これらの方法としては、以下が挙げられる: ステレオリソグラフィ (stereolithography: SLA)、選択的レーザー焼結 (selective laser sintering: SLS)、弾道粒子製造法 (ballistic particle manufacturing: BPM)、および融合堆積モデリング (fusion deposition modeling: FDM)。

【0070】

ステレオリソグラフィは、焦点を合わせた紫外光 (UV) レーザーの使用に基づき、これは、光重合可能な液体ポリマー性材料の浴の上部にわたって走査されるベクトルである。UVレーザーは、この浴を重合化させ、ここでこのレーザービームは、この浴の表面を走向し、表面および表面の真下の第1の固体プラスチック層の作製をもたらす。次いで、この固体層を、この浴へと下降させ、そしてレーザーに生成される重合化プロセスは、所望のデバイスを形成する複数の重ね合わせた層が得られるまで、次の層などの生成を反復する。

【0071】

SLSはまた、焦点を合わせたレーザービームを使用するが、緩い緻密プラスチック粉末の領域を焼結するために、この粉末は、層毎に適用される。この方法において、粉末の薄層は、ローラーメカニズムで平坦な表面上に一様に延展される。次いで、この粉末は、高出力レーザービームを用いてラスタ走査される。レーザービームによって走向される粉末材料は融合されるが、粉末の他の領域は、分離したままである。粉末の連続層は、全体部分が完了するまで、別の上部上

に次のものを、堆積され、そしてラスタ一走査される。各層は、前の層にこの層を結合するに十分深く焼結される。

【0072】

BPMは、液体ポリマーまたはポリマー複合体材料のインクジェット流が使用されてコンピューター制御下で3次元物体が作製されるインクジェット印刷装置を使用し、これは、インクジェットプリンターが2次元グラフィック印刷を生成する方法と同様である。このデバイスは、1つの層を別の層の後に、連続断面を、冷溶接または迅速凝固技術（これは、粒子と連続層との間の結合を生じる）を使用して標的にプリンティングすることによって形成される。

【0073】

FDMは、Z運動を有するx-yプロッターを使用して、ポリマー性材料から形成される押し出し可能なフィラメントを位置付け、加熱または溶媒の存在によって液体を溶かす。

【0074】

移行帯および／または勾配を含むデバイスの材料および構築は、以下の非限定的な実施例を参照することによって、さらに理解される。

【0075】

（実施例1：aを構築するための3次元プリンティング技術の使用）

（複合体デバイス）

骨の機械的強度、密度および重量と類似のそれらを確実にするように設計された骨置換部分は、内部および外部構造の両方において、海綿状骨の出現を必要とすることが論理的に仮定され得る。しかし、上記のように、治療プロセスは、いくつかの段階で生じ、そして骨の形成は、いくつかの場合には、細胞前駆体が新たな骨が形成される前に、移動および分化を受けることを必要とする。従って、骨組織または軟骨組織の治療デバイスの目的は、最終組織構造の立体配置を真似することではなく、むしろ、再生されるべき領域において機械的強度を付与しながら天然の組織形成プロセスを奨励および増強することである。任意のプロセスのように、3DPは、使用される材料および装置の性質によって課される制限を有する。

【0076】

図2は、軟骨の再生のための骨性部位への移植のための移植可能な複合体デバイスの模式図である。この層の黒い領域は、千鳥形のチャネルを作製する孔である。骨について5mmの厚さまでの22層が存在し、この層は、クローバー型の設計を有する。層23～28は移行層であり、次いで層29～38は2mmの厚さを形成し、これらは、軟骨の形成のためである。層1～26は、1cmのクローバー型ステンシルを使用し、そして層27～38は、1cmのディスクステンシルを使用する。各設計の2つの層を、軟骨領域のために作製する。

【0077】

図3a～gは、デバイスの部分、代表的には、骨内に残存することが意図される部分の二次元断面図を意図した形状を示す。複合体デバイスの骨部分を意図した設計を、選択された基準（圧縮強度、細胞接着に利用可能な表面領域、および製作の容易さを含む）に基づいて分析した。他の基準（たとえば、コンピューター制御されたプリンティングよりもむしろマスキングを利用するデバイスを製作する能力）もまた、原型作製の最初の容易さのために考慮した。具体的な基準を、表1に示す。

【0078】

【表1】

表1：骨部分の設計のための決定マトリクス

	チューブ	コイル	クローバー	反転または 陰画クローバー	蜂の巣	スロット
圧縮	良好	良好	良好	良好	良好	良好
剪断	良好	良好	良好	良好	良好	良好
ねじれ剛度	良好	良好	OK	良好	良好	良好
半径	良好	良好	良好	良好	良好	良好
周	OK	良好	OK	OK	良好	良好
接着強度	良好	良好	OK	良好	良好	良好
マスクフレンドリー	OK	No	Yes	No	No	No

最大数の陽性特徴を有する2つの設計は、中空円筒およびクローバー設計であり、その両方は、マスクを用いて製作され得る。蜂の巣設計は、有機溶媒のドロップオンデマンドのためのインクジェットプリントヘッドを使用する製作のための別の候補体である。蜂の巣設計は、高一軸性強度を維持しながら、組織の内植および生物学的相互作用のために、表面積および空隙用量の両方を最大化することを可能にする。

【0079】

(実施例2：最適孔サイズおよび孔隙率の決定)

本明細書中に記載のデバイスは、多孔性だが強度を保持しなければならない、そして骨伝導性材料から構成されなければならない。それゆえ、使用される粉末混合物の初期塩濃度と、最終生成物の特徴との間の関係は、密接に適合していなければならない。設計された孔またはチャネル構造を有する構造の製作は、3DPのような付加的製造プロセスを用いる場合でさえ、興味をそそる作業である。直径数百ミクロンの放射状チャネルまたは垂直チャネルを有する構造が製作され得る；しかし、より狭くかつ曲がりくねった内部構造の形成は、犠牲の材料の使用により最良に達成される。組織操作マトリクスの構築における1つの通常の実施例は、粉末を溶解するための有機溶剤（例えばトルエン）と溶液中に溶解され

た非水溶性ポリマーとの混合物の使用である。塩粒子は、水とともにデバイスの外へ浸出して、多孔性構造を示し得る。この技術は、孔のネットワークを製作する際に有用であるが、孔アーキテクチャのコントロールが失われる。

【0080】

改変された浸出プロトコルを、このデバイスが供される播種および培養条件をより緊密に近似するために適用した。CO₂乾燥サンプルを、1サンプルあたり最少20mlの水を含むNalgeneボトルに配置した。このボトルを、軌道シェーカー（モデル3527, Lab-Line Environ, Melrose Park, IL）に100rpmおよび37℃にて配置した。水を1時間毎に取り替えた。5時間後、溶液中のNaCl含量を、NaClを示す白色沈澱について硝酸銀を用いて評価した。NaClが検出された場合、何も検出されなくなるまで浸出を続けた。サンプルを取り出し、軽くふき取って乾かし、そして真空式デシケータに一晩置いて完全に乾燥させた。浸出をまた、ボールミル装置を室温にて用いて実施し得る。

【0081】

このデバイスの孔隙率を、このデバイスの外に出たNaClの浸出による質量喪失によって決定した。これを、浸出の前および後のこのデバイスの乾燥質量を測定することにより行った。

【0082】

孔隙率は、このデバイスの2つの組織特異的領域の間で変動した。軟骨再生を増強するために特異的に設計された領域では、孔隙率が最大（90%以上）にして、細胞の接着および増殖を促進し、そして細胞外マトリクスの形成のための空間を可能にした。非常に多孔質な構造は、高い表面对容量の比を有する。表面積は、細胞接着について利用可能な部位を最大にするが、使用される材料の量を最少にする。材料を最少にすることはまた、生存成分のための空間を可能にし、そして均一な組織形成を可能にすることに加えて、免疫応答を引き起こし得、そして有害な分解副生成物を潜在的に生成し得る、生存していない外来物質を最少にする。

【0083】

骨に移植されるように特異的に設計されたデバイスの領域では、このデバイスは、より強い機械的強度を提供するためおよび軟骨細胞の接着を妨げるために、多孔性がより低かった。この領域のために選択された材料は、125ミクロン以上の塩粒子の浸出によって作製される、初期に大きな孔サイズを有する、ゆっくりと分解される生体再吸収性 (bioresorbable) 材料である。多孔性の勾配は、連続層中の粉末ベッドの塩含量を変更することにより達成される。

【0084】

ポリ(8-カプロラクトン) (PCL) を、ポリマーとして用いた。(Birmingham Polymers, ロットD96157、200,000MW) として受け取ったPCLを、低温で粉碎し、そして150 μ m未満の粒子サイズになるようにふるいにかけた。粉碎プロセスからの約10%の収量が存在した。光学顕微鏡写真は、大部分の粒子がサイズのほぼ上限に近いことを示した。粒子サイズの分析 (Amherst Process Instruments, Amherst, MA) は、球状の形状と仮定して、平均サイズが115 \pm 2 μ mであることを示した。多くの粒子が、扁長であり、そしてスクリーンの上限サイズよりも長かった。このことは、粉碎プロセスの間の大きな程度の剪断を示す。

【0085】

粉末混合物を、以下の組成で調製した：

1. 100% PCL [$<150\mu$ m] ；
2. 90% NaCl [125 \sim 150 μ m]、100% PCL [$<150\mu$ m] ；
3. 90% NaCl [125 \sim 150 μ m]、5% PCL [$<150\mu$ m]、5% TCP [38 \sim 150 μ m] 。

【0086】

プリント試験—純粋なPCL粉末および粉末混合物を、標準的な試験プロトコル手順のセットに供して、3DPプロセスでのそれらの使用適切性を決定した。これらの手順は、連続した延展試験、滴下試験、バインダー試験、ライン試験、リボン試験および壁試験を含んでいた。

【0087】

延展試験—純粋なPCL粉末は、非常に低い充填密度に起因して比較的乏しく延展する。2つの90% NaCl混合物は、このプロセスで用いた他のポリエステル粉末に匹敵する様式で延展する。200 μ m程度の小さな層は、容易に延展した。

【0088】

滴下試験—10 μ l容量のクロロホルム小滴を、この粉末の各々のベッドに堆積させた。湿潤性は良好であり、そして試験した全ての粉末について、にじみはわずかであった。純粋なPCL粉末は、溶媒との優れた結合強度を示した。90% NaCl粉末混合物は、低い強度の小滴プリミティブ (drop primitive) を生じた。このプリミティブは、比較的低い硬さを有しており、そして柔軟であった。5% TCP混合物からのこのプリミティブは、ゆるく結合しており、そして乏しい強度を有していた。

【0089】

バインダー試験—連続ジェットノズルを用いたクロロホルムの使用は、20 p s iにて1.2 ml/分の定常流速を生じることが見出された。

【0090】

ライン試験—基本粉末ベッドを2 mmの深さに調製し、そしてクロロホルムバインダー流を、1.2 ml/分で確立した。0.75 m/sと1.5 m/sとの間の速度の線を、純粋なPCL粉末および2つの粉末混合物について作成した。弾道 (ballistic) 効果およびにじみ効果は、全てのプリンティング速度で少量であった。純粋なPCL粉末を用いて作成された最少の線は、直径480 μ mであり、そして最大の線は直径670 μ mであった。線のサイズは、90% NaCl粉末に関して測定され得なかった。なぜなら、より遅い速度でプリンティングした場合でさえ、もろいサンプルが粉末ベッドから回収され得なかったからである。

【0091】

リボン試験—基本粉末ベッドを調製し、そしてバインダー流を線試験についてのように確立した。20 mm長および3 mm幅のリボンが、全ての粉末混合物に

関して、 0.75 m/s と 1.5 m/s との間の速度および $75\text{ }\mu\text{m}$ と $150\text{ }\mu\text{m}$ との間の線の間隔を用いて製作された。にじみが小さく、そしてリボンサンプルがベッドから回収され得るような、最適なパラメーターを選択した。

【0092】

最適なパラメーターは、純粋なPCL粉末および10%PCL粉末に関して 125 cm/s 速度および $100\text{ }\mu\text{m}$ の線間隔であり、そして50% PCL混合物に関して 100 cm/s 速度および $100\text{ }\mu\text{m}$ の線間隔であった。純粋なPCL粉末を用いて製作されたリボンは、優れた強度を示した；しかし、粒子の溶解は不完全であった。リボンの二重プリンティングは、より大量に溶解され、そしてゴムの性質を示す粒子を生じた。二重プリンティングは、一般に、増強した溶解および改善された結合について大きなポリマー性粒子($>100\text{ }\mu\text{m}$)を処理する場合に適用される。

【0093】

壁試験—線試験とともにこの試験からのデータを用いて、粉末およびバインダーを用いて予想され得る最小の造形サイズおよび最適プリンティング解像度を決定した。この最終的な試験は、線のセットを複数層の上にプリンティングすることにより、壁を製作することを含んでいた。1本、2本および3本の隣接する線の幅の壁を、90% NaCl : 10% PCL混合物を用いて製作した。壁の中の隣接する線の間隔は $100\text{ }\mu\text{m}$ であり、そして垂直な層の間隔は $180\text{ }\mu\text{m}$ であった。プリンティング速度は 125 cm/s であり、そしてクロロホルムバインダー流速は 1.2 ml/分 であった。得られた壁の厚さは、1つの線の幅、2つの線の幅および3つの線の幅の壁に関してそれぞれ、 0.52 mm 、 0.58 mm および 0.79 mm であった。このことは、プリンティングされた特徴の後ろおよび前の両方の、 $250\text{ }\mu\text{m}$ と $290\text{ }\mu\text{m}$ との間のにじみレベルを示す。これらの値は、他のポリエステル粉末を用いて代表的に遭遇する値よりもわずかに高かった。しかし、これは、大きなポリマーおよびNaClサイズに起因すると考えられる。粒子サイズを減少させることは、プリンティング解像度を改善するはずである。

【0094】

(実施例3：多孔性デバイスを作製するためのPLGA、CaPおよびNaClの混合物)

一緒に混合した3つの粉末：低分解PLGA (D, L-PLGA (85:15))、リン酸三カルシウム (CaP) およびNaClは、機械的に強力なデバイスを生じない。それゆえ、CaPおよびPLGAを、NaClを用いてコアセルベート化した。NaClを溶媒に溶解し、そしてCaPをポリマー溶液中に懸濁した。次いで、このポリマーに関しては溶媒でない溶液を添加し、3種全ての材料を、1つの均質相において溶液から沈澱させた。残りのクロロホルムをこの材料から超臨界CO₂を用いて除去した。なぜなら、液体CO₂は、このような大きな質量には適切でなかったからである。

【0095】

コアセルベート化した材料を容器に入れて密閉し、そして10℃に冷却した。この容器に液体CO₂を750~800 p s iの圧力になるまで充填した。容器に充填した後、出口弁を開けて20 S C F Hにて10分間連続して排気されるのを可能にした。排出期間の後、出口弁を閉じ、そしてこのデバイスを液体CO₂中で5分間保持した。次いで、この容器を、外部水浴ヒーターを用いて40℃ (超臨界状態) になるまで加熱した。温度が増加するにつれて、この圧力もまた増加する。出口弁を開けて、1400 p s iの最大圧力を維持した。サンプルを、40℃より上に10分間維持し、次いでこの容器を10~20 S C F Hにて排気した。

【0096】

使用されるD, L-PLGA (85:15) は最初に、これらの条件ならびにより穏やかな液体CO₂条件下で変形された。このことは、最終生成物が、残りのクロロホルムを取り除くために必要な処理後の条件に耐え得ないことを強く示した。さらに、この材料はまた、三次元プリンティング処理における使用のために、150 μm未満にまで粉碎されなくてはならなかった。冷却ジャケットを備えた小さな分析用ミル中でのこのコアセルベート化材料の粉碎によって、変色された。グレイ色の変色は、ミルからの鉄の混入物または分解されたポリマーのいずれかであると考えられた。エネルギー分散X線分光法分析を使用して、有意な

量の鉄が、粉碎されたコアセルベート中に存在しないことを決定した。その後の経験と組み合わせて、この結果から、このポリマーは粉碎の間に分解すると決定された。L-PLGA (85:15) を使用して、粉碎の間のポリマーの分解の問題を回避した。D, L-PLGAとは異なり、L-PLGAは、結晶性であり、そしてより高い融点を有する。このコアセルベーションプロセスが首尾良いことを確認するために、ポリマーに対するリン酸三カルシウム (CaP) の比率を、ThermoGravimetric Analysis (TGA) によって決定した。この材料の10~50mgサンプルをTGA装置 (Perkin-Elmer, Series 7, Norwalk, CT) に置き、そして5℃/分で500℃まで加熱した。この温度で、すべてのポリマー性材料は気化し、そしてサンプルは一定の重量に達した。CaPについての結果をコアセルベート化CaP-PLGAサンプルと比較することによって、各サンプルのポリマー重量画分を算定した。最初のTGAは、回収された材料の比率が、使用された材料の比率と一致することを示した。

【0097】

(実施例4：PLGAコアセルベートからの骨デバイスの調製)

ポリマーおよび骨複合体を、以下の3つの異なる方法によって製作した：(1) 粉末ベッドにおいて、所望の比率で、骨の純粋な粉末とポリマーとを混合すること；(2) 骨粉末ベッドにポリマー溶液をプリンティングすること；および(3) それ自体で骨およびポリマーの複合体である粉末を形成すること。

【0098】

(材料) 1~3mmの小粒の形態の、Boehringer-Ingelheimからのポリ-L-乳酸 (PLLA, Mw=50,000) およびポリラクチド-コグリコリド (PLGA, Mw=115,000) を、遠心ミル (Glen Mills, NJ) を用いて低温で粉碎した。ミリングチャンバーを、液体窒素で部分的に充填し、液体窒素および粉末のスラリーを導入し、そして粉碎を開始した。液体窒素は、粉碎処理の間に、ポリマー温度をガラス転移温度 (T_g) 未満に維持する。処理された粉末を回収し、減圧オーブン中で24時間乾燥し、そして1時間、機械的にふるいにかけ、粉末を異なる粒子サイズに分類した。

【0099】

ウシ皮質骨を、上記の低温での粉碎のために3～5mmのブロックに分けた。粉碎した骨を乾燥し、そして50%の20～45 μm 範囲の骨粉末および15%の20 μm 未満の骨粉末の収率でふるいにかけた。

【0100】

これらの2つの型の粉末の混合物を用いるアプローチは、適切ではないことがわかった。なぜなら、粒子が45～75 μm である場合に、粉末とバインダーとの相互作用は適切な粒子結合を生じなかったからである。粒子が20 μm 未満であった場合、液体のウィッキングは乏しい分解能を生じる。

【0101】

骨粒子ベッド上に溶解されたポリマーでプリンティングすることは、低分子量(50,000)の分子量ポリマーにのみ適切である。このことは、より高い分子量ポリマーに関して生じる十分な濃度の溶液中で発達される、受容可能ではない高粘性に起因する。プリンティング溶液中でのより濃縮されていない溶液および低い分子量ポリマーの使用は、骨再生に対して受容可能ではなく低い生成物デバイスの強度を生じる。

【0102】

骨およびポリマーコアセルベートの生成を、セラミック生地を生成するために使用されるセラミック製作の分野において周知の技術を用いて達成した。このプロセスは、マイクロカプセル化技術に類似する。粒子(この場合、セラミックではなく、骨)は、骨粒子がポリマーでコーティングされるようになり、ポリマー溶媒中に懸濁されたままであるのを引き起こすような様式で、ポリマー溶液中に分散される。このコーティングされた粒子は、ポリマーに対する非溶媒の添加によって、一定の質量の材料に堆積される。この場合において、骨粉末(20～45 μm)を、ポリマー溶液(クロロホルム中、5～10重量%のPLGA)に分散し、骨およびポリマーの1:1混合物を形成した。25MHzで5分間の超音波処理は、骨粒子を均一に分散した。次いで、イソプロパノールを、懸濁液:イソプロパノールの最終容量比率3:1にまで添加し、ポリマーを硬化し、コアセルベートを生成した。固体を回収し、濾過し、そして減圧下で乾燥させた。次い

で、コアセルベートを粉碎し、骨粒子およびポリマーを、代表的には $50\mu\text{m}$ の範囲で生成した。

【0103】

コアセルベート材料を、プリンティング材料として使用されるクロロホルムとともに、粉末ベッド中で使用した。小滴の配置を、プリンティングされることが望まれるパターンのレーザー切断孔を有する薄いステンレス鋼板のマスクを用いることによって達成した。この材料を、所定のチャンネルアーキテクチャを有するデバイスを製作するために首尾良く使用した。このデバイスは、約50重量パーセントの骨および60容積パーセントの骨であった。デバイスの圧縮弾性係数 (compressive elastic modulus) は、約50GPaである。

【0104】

(実施例5：塩浸出により作製されるポリマーおよびCaPの多孔性デバイス)

この実験において、ポリマーおよびリン酸三カルシウム(TCP)のような無機粒子を含む2つの組成を比較した。一方の組成は、35%NaClおよび2：1比率のPLGA対TCP(35%多孔性)であり；他方は、45%NaClおよび3：1比率のPLGA対TCP(45%多孔性)であった。NaClがデバイスから浸出される速度を調査するために、組成からの塩損失を算定する2つの方法を、ボールミルまたは軌道振盪機(orbital shaker)のいずれかによって生じる攪拌を用いて水中で浸出されるデバイスに対して用いた。CO₂乾燥サンプルを、20mlの水中に置き、そして100rpmおよび37℃で、ボールミリングデバイス(U. S. Stoneware, East Palestine, OH)中、または軌道振盪機(Model 3527, Lab-Line Environ, Melrose Park, IL)上のいずれかに置いた。水を、各時間交換し、そして硝酸銀沈降によって残りの塩についてモニタリングするデバイスから水を除去した。

【0105】

NaClがデバイスの組成から除去される程度を定量するために、両方の方法

によって浸出した骨デバイスに対して要素分析を行った。さらに、骨デバイスの浸出間のポリマー、NaCl、水および空気の容量画分を、軌道振盪機を用いて浸出されたデバイスに関して測定した。

【0106】

要素分析の結果を表2に示す。要素データによって、より長い期間の浸出が、より多くのNaCl画分の除去により有効であることが確認された。浸出の4時間後に、35%の多孔性サンプルは、 176 ± 3 ppmのSodiumを含んだ ($n=3$)。浸出の5時間後に、45%の多孔性サンプルは、 0.5 ± 0.1 %のSodiumを含んだ ($n=3$)。これらのSodium値は、0.04%および1.3%のNaClのみが、軌道振盪機での浸出を経た後にデバイス中にとどまったことを示す。

【0107】

【表2】

表2: NaCl浸出後の骨デバイスの要素分析

最初のNaCl	方法および時間	PLGA (重量%)	TCP (重量%)	NaCl (重量%)
35%	理論	67	33	-
"	ボールミルで3時間	62	28	7.4
"	振盪機で4時間	69	29	0.04
45%	理論	75	25	-
"	ボールミルで3時間	57	17	22
"	振盪機で5時間	76	22	1.3

多孔性算定によって、これらの2つのバッチが99%の取り込まれたNaClを損失することが確認された。有意な浸出の後、TCPに対するPLGAの比率

プロセス間に損失されていなかったこと、そして多孔性ネットワークでの不連続性は、これらのNaClローディング（すなわち、35重量%および45重量%）にて重大なことではなかったということが示唆される。

【0108】

密度測定装置を使用して、このデバイスの全体の孔隙率を測定した。各成分の容積割合についての計算は、浮力、このデバイスの乾燥重量、デバイスの寸法、および各材料の密度の測定を包含していた。この方法による容積割合の計算は、信頼できないことが分かった。いくつかの観察を行って、このデータを考慮した。第1に、わずか30分間の浸出の後ですら、水がこのデバイスの実質的割合を占有した。このことは、毛細管効果および親水性効果に起因して、浸水が比較的急激であったことを示した。第2に、NaCl溶解および／または拡散が、浸水の速度よりむしろ、浸出の律速段階であったことが確認された。これらの結果は、NaClが溶解するにつれて、水がNaClとゆっくりと置換したことを示唆する。

【0109】

結果は、35% NaClデバイスが7時間後に十分に浸出した；しかし、45% NaClデバイスでは、7時間の浸出の後ですら、NaClが残存したことを示唆する。両方の骨デバイスバッチにおいて、空隙容積は、浸出期間全体の間で比較的一定であった。最終的な残存レベルは、約13%であった。これは、浸出が完了する間に、水が全ての空気およびNaClと置換されたはずであると考え、予測外の観察であった。トラップされた空気ポケットがサンプル中に存在し得る。このことは、たとえば、ポリマーの密度（ 1.3 g/cm^3 ）およびNaClの密度（ 2.17 g/cm^3 ）が水（ 1.0 g/cm^3 ）より大きいとしても、なぜいくつかのデバイス（例えば、軟骨バッチ）が浸出の間に浮遊するのかを説明し得る。

【0110】

これらの測定から誘導された組成計算は、全ての時点での元素分析に基づく測定に、厳密には匹敵しなかった。3時間でのデータは、浸出条件の差異にも拘わらず、十分に相関し、NaCl含量は、35%のサンプルについては6%および

45%のサンプルについては23%であった。組成物中で生じたNaCl値の間の不一致は、より長い浸出期間についてのデータから算出された。浸水研究における考えられる誤差の源としては、以下が挙げられる：1) このデバイスが乾燥重量測定時に十分乾燥していなかったかもしれないこと、2) このデバイスの寸法が支柱を含んでいたこと、3) このデバイスが完全な円筒形であったという仮定、および4) ポリマー、NaClおよびTCPに用いられた密度値。

【0111】

この結果は、NaCl溶解および／または拡散が、浸水の速度よりむしろ、浸出の律速段階と一致する。さらに硝酸銀アッセイは、完全な浸出の容易かつ正確な予測変数であったことを決定した。

【0112】

(実施例6：無機粒子を含む多孔性デバイスの機械的強度)

PLGA、TCPおよびNaClを含有する骨デバイスインプラントの機械的特性を、この研究において調査した。用いたL-PLGAは、38~150 μ mに粉碎した242,000MW (ロット D97157, Birmingham Polymer Inc.) の(85:15) コポリマーであった。TCP (ロット 95H0644, Sigma) を、125~150 μ mであったバッチB5を除いて、38~150 μ mの粒子サイズ範囲で用い、そして75~150 μ mの粒子サイズのより大きなNaCl (ロット 965737, Fisher) を用いた。

【0113】

表3に列挙した5つの異なる組成のサンプルを二次加工して、引っ張り特性および圧縮特性に対する、孔隙率および無機物質含量の影響を研究した。標本を二次加工するために使用したパラメーターを表4に提供する。1~4の組み合わせを指示Aを用いて製造し、そして組み合わせ5を指示Bを用いて製造して、実際のデバイス製作条件により近づけて再現した。全てのサンプルを液体CO₂で乾燥させて、残りのクロロホルムを除去し、そして浸出させて試験前にNaClを取り除いた。可能な場合、American Society of Testing and Materials (ASTM) 試験基準を遵守したが、わず

かな改変を行って、製作および試験プロセスを単純化した。弾性係数、降伏強さ、引っ張り強さ、伸長パーセント、および圧縮強さについての値を負荷－排水量曲線から得た。

【0114】

【表3】

表3：機械的試験の研究のために作製されたサンプルの概要

バッチ	NaCl	L-PLGA	TCP	PLGA:TCP
B1	25%	50%	25%	2:1
B2	35%	43%	22%	2:1
B3	35%	50%	15%	3.3:1
B4	40%	45%	15%	3:1
B5	55%	34%	11%	3:1

粉末の正しい組成を粉末ベッドに配置して、必要なサンプル数を生成した。両面テープを用いて、初期の粉末拡散を改善し、そして3層の支柱をプリンティングの間にレーンをとばすことにより構築した。支柱は、実際の作業片についての機械指示を始める前にこの粉末ベッドにおいて形成された平行隆起であり、この作業片についての機械指示は、構築プラットフォーム上の粉末ベッドから作業片を取り出すことを容易にする。サンプルを指示Aを用いて二重プリンティングし、そして指示Bを用いて1回プリンティングした。引っ張り標本は、20層であり、そして圧縮サンプルは、60層であった。製作の後、このプリンティングプレートでデシケータ中に24時間入れた。次いで、標本を一晩窒素棚に入れて、クロロホルムの大部分を除去した。

【0115】

【表4】

表4
使用された製作パラメーター

指示A	指示B
機械バージョン: MIT 3D プリンタ	機械バージョン: TheriForm TM
流速: 1.2ml/分	流速: 1.2ml/分
リザーバ圧力: 20psi	リザーバ圧力: 20psi
型付け速度: 1.1m/s	型付け速度1.25m/s
ライン間隔: 150 μ m	ライン間隔125 μ m
層高: 200 μ m	層高: 200 μ m
支柱高: 300 μ m	支柱高: 300 μ m

(引っ張り試験) 引っ張り試験標本を、ASTM標準D638-96に合わせた寸法で製作した。特注製作のマスクを用いて、図2に記載されるような適切な寸法のサンプルを作製した。Instron Testing machine 4201を、引っ張り試験および圧縮試験の両方のために用いた。圧気グリップ (pneumatic grip) (Instron type 2712) を用いて、30psiの外気圧で正しい位置に標本を保持した。この手順は、サンプルの広幅の切片のいくらかの変形を生じた。このグリップから標本まで負荷が確実に良好に移行するように、グリップの遠端にスペーサーを使用することが必要であった。0.1mm/分のひずみ速度を5つの異なるサンプルに適用し、そして負荷をプロセスの間に記録した。置換を、プラスティシンの下面で、伸長メーター (extensometer) (Instron, カタログ番号2620-826、移動+/-0.254mm) を用いて測定した。初期断面積を用いて以下の計算を補助した。ヤング率を、材料がたわむ前のひずみに対する応力の比率として計算した。引っ張り強さを破断前のピーク応力として見出した。引っ張り試験標本の寸法は、以下の通りであった。LO=50mm、L=9.53mm、T=3.2mm、R=12.7mm、W=3.14mm、H=9.53mm。

(圧縮試験) 圧縮試験を、ASTM D695-96標準に従って行った。このプロトコルは、その直径の二倍の長さを有する円筒状標本を用いることを推奨していた。この研究において使用するために、6mmの直径および12mmの長さのサイズで円筒状サンプルを製作した。各組成の5つの標本を、上記の引っ張り試験と同じInstronを用いてこの試験に供した。目の細かい紙ヤスリを用いて表面の異常を除去した後、このサンプルを、上部の圧縮盤の表面と、底部の圧縮アンビルとの間に置いた（上側の圧盤についてはInstron、カタログ番号2501-107、下側のアンビルについては2501-085）。0.5mm/分の速度で、7%と20%との間のひずみまで圧縮を行った。ほとんどの場合、この標本は、制御された様式で負荷されず、そしてヒステリシスを記録した。均質な変形を仮定した。初期断面積を、以下の計算で用いた。圧縮強さを、初期線形領域からの線および終末線形領域からの線が交差した時点と規定した。弾性係数を、引っ張り試験におけるように得た。

【0117】

【表5】

表5: 張力および圧縮の試験についての機械的特性データ

組成			引張り強さ	ヤング率	圧縮	弾性係数
NaCl (%)	TCP (%)	L-PLGA (%)				
25	25	50	5.7 ± 1.0	200 ± 57	13.5 ± 0.3	233 ± 26
35	15	50	5.5 ± 0.8	233 ± 27	13.7 ± 0.8	450 ± 79
35	21.7	43.3	3.3 ± 0.4	180 ± 14	6.5 ± 0.2	184 ± 12
40	15	45	4.0 ± 0.5	183 ± 35	7.0 ± 0.9	180 ± 50
55	11.25	33.75	1.6 ± 0.2	83 ± 18	2.5 ± 0.1	54 ± 17
文献値						
ポリ(DL-ラクチド-ε-カプロラクトン) (85:15) ^a			1.6	160	-	-
ポリ(DL-ラクチド-ε-カプロラクトン) (50:50) ^b			41-55	1,380-2,760	-	-
ポリ(L-乳酸) 100,000 MW ^c			50	2,700	-	-
ヒト海綿質骨 (新鮮) ^d			~8	700-1,000	10-20	-
ヒト皮質骨 (新鮮) ^d			~100	~15,000	~150	-
* n = 3 ± 0.04						

L-PLGA (85:15)、塩およびTCPの組成が全体的に変動されるサ

た値の要約を、表5に提示する；各々の点は、3～4の異なる標本の平均を表す。引張り強さおよびヤング率もまた、表5におけるいくつかの参照物質に対して与えられる。25% NaCl、25% TCP、50% L-PLGAについての張力データは、グリップにおける滑りに起因して評価することが困難であり、過度のひずみを生じる。列挙された値は、ポリ(DL-ラクチド-コ-カプロラクトン) (85:15) 130,000 MWおよびポリ(L-乳酸)についての参考文献から得られた値に匹敵する強度であることに留意すること。

【0118】

以下の一般的な知見がなされた：(1) 孔隙率の増大は、弾性係数、引張り強さ、および降伏強さを低下させた；(2) ポリマー含量の増大は、その強度および弾性係数を増大させた；(3) TCPのより高い画分を有する標本は、張力下で脆性破壊を示す傾向があったが、一方、TCPのより低い画分を有するサンプルは、延性破壊を示した；そして(4) TCP含量の増大は、伸長パーセントを失敗まで減少させた。

【0119】

このデータは、いくつかの予期された傾向を示す。デバイス内の間隙画分が25%から55%に増大するにつれて、張力および圧縮強さの両方が減少する。同様に、1つの特異な結果を除いて、ヤング率および弾性係数は、間隙フラクションが増大すると減少する。ヤング率の値(張力試験によって得られる)が、理想状態の下で、圧縮試験により得られる弾性係数の値に厳密に対応することを予測する。しばしば、圧縮試験により得られた値は、プレートからの摩擦に起因してわずかに高い。本明細書で試験したサンプルにおいて、このような一致が、2つの異なる方法の間で得られた(35% NaCl:15% TCP:50% PLGA標本の例外を除く)ことは、印象的である。これは、特に重要である。なぜなら、製作中のデバイスの配向は、各試験に使用されたサンプルにおいて同じではなかったからである。張力試験は、構築されたサンプルを用いて実行され、その結果、層がひずみの方向に整列されるが、一方、圧縮サンプルが構築され、その結果、この層は、ひずみの方向に正常に整列された。

【0120】

純粋な、濃密L-PLGA (85:15) 242, 000 MWポリマーについての値は利用可能ではないが、PLA/PCl (85:15) 200, 000 MWの値に匹敵することが予測される。全ての多孔性デバイスについての強度および弾性係数パラメーターは、この参照ポリマーについて報告されたものを超える。これらのデバイスの引張り強さおよび圧縮強さについての値は、海綿質骨のものに匹敵する。このことは、これらのデバイスがインビボでの適用について受容可能な機械的特性を有することを示唆する。

【0121】

(実施例7：チャンネル構造を有するポリマー成分)

軟骨再生を奨励するように特異的に設計されたデバイスの開発は、2つの主要な考慮（材料の選択および巨視的アーキテクチャ）を前進させる。この材料の組成は、高い孔隙率を生じ、かつ数週間以内に分解するように選択される。PLGAおよびPLAを含む、2つの主要なポリマーの組合せを、軟骨デバイスにおけるそれらの使用について評価した。巨視的千鳥形 (macroscopic staggered) チャンネル構造の2つの改変物が、開発された。この巨視的チャンネルの目的は、細胞の播種および増殖を促進することであった。所望の巨視的チャンネルサイズは、構造統合性または均質な組織形成を損なうことなく細胞の播種を利用可能にする表面積を最大化するために、およそ200 μm に選択された。

【0122】

(軟骨バッチA)

バッチAといわれる軟骨デバイスのこのバッチは、L-PLA 27, 000 MW (Birmingham Polymers) に対する遊離酸性側鎖を有する、1:1の比率のD, L-PLGA (50:50) 50, 000 MW (Boehringer Ingelheim) を備えた。このポリマー性粒子サイズは、63~106 μm であった。遊離酸性側鎖を有するPLGAは、このデバイスの分解の速度を増大させるように選択された。なぜなら標準的なPLGAを用いた以前の結果は、より速い分解が望ましくあり得ることを示唆したからである。90重量%のNaClおよび10%のPLA-PLGA混合物は、高い孔隙率を

得るために使用された。この孔サイズは、NaCl粒子サイズ（これは、106～150mmである）よりも大きいことが予期された。37℃で48時間オービタルシェーカー（orbital shaker）上で浸出した後に、これらのデバイスは、直径において8.3%および厚さにおいて20%縮小した。このディスクは、硝酸銀アッセイに従って、90%の重量の損失（すなわち、孔隙率）を伴って、7時間後に完全に浸出した。残留クロロホルムは、これらのディスクにおいて検出されなかった（ $n=5$ ）。

【0123】

バッチAは、図4fに示されるように、このデバイスの厚さを完全に通っていない千鳥形チャンネルを備えた。これは、骨領域が巨視的チャンネルを備えていない軟骨-骨複合体デバイスをモデル化することであった。このディスクの直径（すなわち、アーク）を横切る溝を備える層を備える、巨視的千鳥形チャンネル構造が、作製された（図a～d）。一番下の層は、巨視的チャンネルを備えなかった（図4e）。溝は、この層にある0.675mm幅の切片上にクロロホルムを堆積させないことによって形成された。これらの溝は、2.05mm離れて間隔を空けられた。16個の穴は、これらの溝に重ねられた、デバイスの1番上の表面上に形成された。これらの穴は、1層の溝にプリンティングし、プリンティングベッド（print bed）を90°回転させ、そしてさらなる粉末をまぶすことなく別のセットの溝にプリンティングすることによって形成された。これを、クロロホルムを備えるデバイスマトリクスの重要な部分に効果的に二重プリンティングした。二重プリンティングはまた、ポリマーをより完全に溶解し、それによってこのポリマー性粒子間により強い連結を作製することによって、最終デバイスの機械的特性を改善し得る。チャンネルサイズは、実際のデバイスにおいて $182 \pm 37 \mu\text{m}$ であることが観察された。このアーキテクチャ設計の欠陥は、2セットの溝が互いに平行に置かれ、構造的な弱さを潜在的に引き起こすことである。これは、このデバイスが空間的に播種される場合には重要なことではない。

【0124】

断面図の走査電子顕微鏡写真（Evans East, Plainsboro, NJ）は、千鳥形チャンネルの証拠を示す。これらの特性のいくつかは、このデ

バイスを区画化する場合に失われた。表面のSEMはまた、100ミクロンよりも大きい第1の孔、および10ミクロン未満のサイズを有する第2の孔を備える多孔性ネットワークを示す。

【0125】

(軟骨バッチB)

バッチBといわれる軟骨デバイスは、単独型軟骨配置製品として製作された。このデバイスは、バイオリアクターにおける培養条件の間の流体の流れに抵抗するために十分な強度を必要とした。バッチBは、バッチAと類似しているが、いくつかの改善が、これらの性能要件を満たすために、材料の組成および巨視的アーキテクチャにおいてなされた。流体の流れからの圧力の構築を最小化するために、このデバイスを完全に通っている巨視的チャンネルが、図5fに示されるように使用された。さらに、壁を支持することが、長い溝を備える層において使用され(図5bおよびd)、そしてこれらの溝付き層が、互いに90°オフセットであった。チャンネルは、図5a、c、およびeにおいて示される。これらのデバイスの材料およびアーキテクチャは、軟骨-骨複合物の軟骨領域において使用されたものと同じであった。図5fは、バッチBのデバイスの模式的な断面図を示す。巨視的チャンネルは、より上の角に輪郭づけられた暗い領域である。

【0126】

(塩の浸出)

48時間浸出した後に、これらのデバイスは、直径において5.3%、および厚さにおいて7%縮小した。7時間浸出した後に、これらのデバイスは、硝酸銀アッセイに従って、完全に浸出された。これらのデバイスは、計画された設計と一致して、浸出からの重量変化に基づき、90%の多孔性であると見積もられた。残留クロロホルム分析は、約50ppmのより低い検出限界を有し、無視可能な量のクロロホルムが存在したことを示唆する(n=4)。

【0127】

(示差走査熱分析)

示差走査熱分析を、1:1の比率のD, L-PLGAおよびL-PLAを含むデバイスの加工されたバッチ上で実施した。D, L-PLGAは非結晶であり、

そしてL-PLAは結晶であるので、これらのデバイスは、ガラス転移温度および融解温度の両方を有した。53℃のガラス転移温度および161℃ ($n=3$) の融解温度を有した全てのバッチは、製作が行われる間の一貫した物理的特性を示す。

【0128】

(実施例8：軟骨および骨再生のための複合体デバイス)

骨軟骨性欠損の根本的骨への挿入および固定化のために、上部軟骨成分、移行帯、ならびに下部骨成分から構成される構造を有するデバイスを作製した。軟骨-骨複合体の骨の部分において使用される材料は、緩慢に分解するPLGA、リン酸三カルシウム(CaP)、およびNaClである。NaClを、最終的なデバイス中で微小孔を形成するように浸出した。

【0129】

軟骨-骨複合体デバイスの試行バッチを、骨領域、移行領域、および軟骨バッチA (Cartilage Batch A) と同じ微小孔チャンネルを有する軟骨領域を用いて加工した。この生成物の全体の寸法は、乾燥工程および塩浸出工程の前に8mm×1cmであった。この開発バッチの目的は、最終的なデバイスのラミネーションおよび機械的安全性を評価するためであった。

【0130】

(軟骨-骨複合体設計の説明)

16の千鳥形チャンネル(staggered channel)を、これらのデバイスのマイクロアーキテクチャへ組み込んだ。このチャンネルは、公称0.675mm四方であり、そして2.05mmの間隔を空けた。2層のチャンネルを、3層の壁(幅1.375mm、および2.05mmの間隔を空けた)によって分離した。取り外し可能なプリンティングプレートを使用して、ステンシルの下に粉末ベッド(powder bed)の回転を可能にした。各々のチャンネル層は、回転しない粉末ベッドおよび回転した粉末ベッドの上でのプリンティングを含んだ。手動のローラーを用いて粉末を拡散した。

【0131】

5つの異なるポリマーの組合せを、この粉末ベッドにおいて使用して、軟骨-

骨のディスクを作製した。このシーケンスは、以下の通りであった：3層の支柱、22層の骨領域、6層の移行領域、および千鳥形チャネルを使用する10層の軟骨領域（表6）。両側タップを適用し、そして支柱を各々200 μ mの3層から構築した。支柱を、1脚あたり2つの隣接線を有する、十字線配置にプリンティングした。領域1についてのポリマーの組合せは、支柱およびデバイスの骨部分を構成した（層1～22）。1cmのクローバー型のステンシルを、骨および最初の2つの移行領域のために使用した。あらゆる2つの粉末の層を有する領域2、3および4についての粉末組合せを、拡散した。領域5についての粉末組合せは、デバイスの軟骨部分を構成し、これは、10層のチャネル構造を含んだ。領域5についての構造は、図5に示され、そして実施例6において軟骨バッチB（Cartilage Batch B）について記載される通りの設計を使用した。チャネルの構築は、層上にプリンティングし、次いでプレートを90°回転すること、次いで、同じ層に再びプリンティングを必要とした（特定のパターンにおいて）。このプレートの右上端を、ピストンハウジング（piston housing）の壁に記録した。4×4配列に配置された16のチャネルは、公称0.675mm四方であり、そして2.05mm離れて間隔を空けた。2層のチャネルを、2層の移行チャネルによって分離した。移行チャネルは、通常のチャネルに類似したが、公称0.675mmの幅および1.90mmの長さであった。

【0132】

得られた軟骨-骨複合体デバイスは、材料の勾配に加えて、特有の巨視的アーキテクチャを含んだ。このデバイスの底は、約5mm厚であり、そして増強された骨内殖クローバー型のステンシルで加工した。次の6層は、クローバー型のステンシルを使用して底の4層を有する移行領域を含んだ。この移行領域の上2層は、ディスクステンシルを使用して、機械的強度の重要性を回避した。この複合体の最上層の2mm（軟骨領域）を、微視的な千鳥形チャネルアーキテクチャを用いて加工した。少しの改変により、このデバイスの構造的保全性を増強させた。増加した支持について、薄壁を、長溝に付加した。この溝はまた、互いに関して90°回転していた。

【0133】

骨－複合体デバイスについての最良の結果を生じる、製作パラメーター、機械設定および材料を、以下に示す。

【0134】

プリンティングパラメーター：流速： 1.2ml/分

リザーバー P： 18psig

プリンティング速度： 125cm/秒

線幅： 125 μ m

材料：

バインダー＝溶媒：100%クロロホルム (Fisher Scientific)。

【0135】

【表6】

表6. 領域および層による粉末ベットの構成成分

領域	層 200 μm @	粉末成分	粉末ベット の重量%	粒子サイズ	ステンシル (形状)
支柱	-3 層	以下と同じ			
1-骨	1-22	NaCl L-PLGA (85:15) 242,000 M.W リン酸三カルシウム	55.0% 33.8% 11.2%	125-150 μm 38-150 μm 38-106 μm	1 cm クローバー型
2-移行	23-24	NaCl L-PLGA (85:15) 242,000 M.W L-PLA 27,000 M.W. D,L-PLGA (50:50) 50,000 M.W	65% 30.0% 2.5% 2.5%	106-150 μm 38-150 μm 63-106 μm 63-106 μm	1 cm クローバー型
3-移行	25-26	NaCl L-PLGA (85:15) 242,000 M.W L-PLA 27,000 M.W. D,L-PLGA (50:50) 50,000 M.W	75.0% 15.0% 5.0% 5.0%	106-150 μm 38-150 μm 63-106 μm 63-106 μm	1 cm クローバー型
4-移行	27-28	NaCl L-PLGA (85:15) 242,000 M.W L-PLA 27,000 M.W. D,L-PLGA (50:50) 50,000 M.W	85.0% 5.0% 5.0% 5.0%	106-150 μm 38-150 μm 63-106 μm 63-106 μm	1 cm 円板
5-軟骨	29-38	NaCl L-PLA 27,000 M.W. D,L-PLGA (50:50) 50,000 M.W	90.0% 5.0% 5.0%	106-150 μm 63-106 μm 63-106 μm	1 cm 円板

いくつかの異なる材料組成を、骨領域、移行領域および軟骨領域を形成するために複合体デバイス構造へ組み込んだ。この材料を選択して、収縮の有害な効果を最小化した。固定化した変数は、軟骨領域および浸出温度（細胞培養のために使用される温度）について90% NaClの含有量であった。

大きなサイズの複合体（高さ8 mm）は、以前のディスクデバイスよりも非常に長い期間浸出することを必要とした。軟骨領域が酸性側鎖なしにD, L-PLGAから構成された場合に、長期間の浸出（> 24時間）が曝露の間に軟骨領域を軟骨と移行領域との間で層剥離が発見された。層剥離の原因は、これらの2つの領域間の有意なレベルの示差的な収縮に起因した。隣接する移行領域は、直径において、軟骨領域の8.3%と比較して3.8%のみの収縮を見出した。これは、過剰な剪断応力を生じ、そして最終的には層剥離を生じた。収縮のこのレベルは、以前に受けず、そして浸出プロセスまたはデバイス組成のいずれかにおける変化が、層剥離に寄与し得る。

【0137】

研究を実施して、収縮を生じると疑われるパラメーターを調査し、そして複合体デバイスの構造的保全性を改善した。このアプローチは、軟骨領域収縮の量を減少すること、または移行領域のより多い収縮を奨励することのいずれかであった。この研究の結果を、以下に示す。

1. 液体CO₂を含有する残りの溶媒を除去して、収縮を有意に減少した。
2. 収縮は、浸出時間を増加するにつれて増加した。
3. 室温での浸出は、37℃での収縮と比較して収縮を減少した。
4. 収縮は、浸出期間の間に生じ、そしてその後、乾燥の間には生じなかった。
5. 遊離酸性側鎖を有するPLGA（50：50）の使用は、規則的PLGA（50：50）に対して収縮を増加した。
6. 90% NaClを含むデバイスは、85% NaClを含むデバイスよりも収縮する。
7. 巨視的チャネルは、収縮を十分に引き起こさなかった。
8. 製作において使用された層の厚さは、収縮に影響しなかった。
9. 二重プリンティング（対単一プリンティング）は、収縮を引き起こさなかった。
10. 結晶L-PLA 141,000 MWおよび75%または90% NaClから構成されるデバイスは、2%未満を収縮する。

【0138】

L-PLAは、57～65℃のガラス転移温度を有し、そしてD, L-PLGA (50:50)は、45～55℃付近でガラス転移することが、報告されている。1:1の比のD, L-PLGA (50:50) 50,000とL-PLA 27,000を用いて作製されたデバイスは、約53℃のガラス転移温度を有する。従って、37℃にて浸出する間の非結晶質ポリマーの塑性流動に起因して、収縮が生じたのではないようである。これらの結果は、2つの可能性を示唆する。このデバイス中のポリマーは、そのNaCl粒子の周囲に、残余する (residual) 弾性ひずみを含む。この支持するNaClが浸出されてしまった場合、このポリマーは、部分的にへこみ得、このデバイスがこの浸出プロセスの間に受ける水圧におそらく起因して、このデバイス全体の寸法の収縮が生じ得る。

【0139】

従って、この収縮研究によって決定されたような軟骨デバイス作製のための最も有望な候補は、酸性側鎖を有さないPLGAの使用、および浸出前のCO₂乾燥であった。1:1の比率のD, L-PLGA (50:50) 50,000MWとL-PLA 27,000MWを、この軟骨領域に使用した。この移行領域は、この軟骨領域から骨領域までに、85%～65%のNaCl勾配、10%～5%の1:1 PLGA:PLAの勾配、および5%～30%のL-PLGA (85:15) 242,000MWの勾配を含んだ。この骨領域を、55%のNaClおよび3:1の比率のPLGA (85:15):TCPを用いて作製した。これを、骨伝導および力学的強度について推定上最適な組成として選択した。この複合デバイスを、37℃の静的PBS溶液中で1ヶ月の間インキュベートして、力学的完全性を確認した。層剥離または他の欠損は、観察されなかった。

【0140】

(このデバイス設計の実施) このデバイスの軟骨部分における巨視的千鳥形チャネル (macroscopic staggered channel) は、軟骨細胞が、1つの表面上のみではなく、このデバイスの厚みを通じて、インビトロで播種されることを可能にする。これは、軟骨形成のために重要である。なぜなら、軟骨細胞は、約2mmよりも大きな距離を超えては、容易に移動し得な

いからである、従って、この千鳥形チャンネル設計は、軟骨細胞が、このデバイスの軟骨部分の中心に直接播種することを促進する。より均一な播種によって、より速く均一な軟骨形成が促進される。関連して、この千鳥形チャンネルは、細胞増殖培地における培養の間の、その細胞への栄養分の輸送、ならびに、細胞副生成物およびポリマー分解副生成物の、その細胞からの除去を、促進する。このデバイスの骨移植可能部分は、以下の2つの理由が原因で、千鳥形チャンネルを有さない：骨細胞が非常に遊走性であり、従って、このような立体配置を必要とせず、そしてこのデバイスのこの部分に対して力学的強度を付与する必要がない。後者の特性は、重要な特徴であり、このデバイスが外科的移植の力を耐えることを可能にする。

【0141】

(実施例9：組織操作置換体として使用するための足場 (s c a f f o l d)

)

多数の細胞型によるインビボ組織形成を、真皮、軟骨または平滑筋をヒト移植用に操作するための、生分解性合成足場または生体安定性 (b i o s t a b l e) 合成足場上で試験した。足場は、その化学、構造 (例えば、寸法、構成、孔サイズ、または間隙画分 [V F]) および製作 (例えば、織った、編んだ、不織布状にされた、スポンジのように溶媒キャストされた、または上記のように3-Dプリンティングされた) によって、異なった。材料は、ナイロン、ポリ (グリコール酸)、ポリ (エチレンテレフタレート)、ポリ (ε-カプロラクトン)、ポリ-L-乳酸またはポリ (D, L-ラクチドコグリコリド) /ポリ (L-乳酸) を含んだ。ヒト由来細胞または動物由来細胞 (真皮および動脈繊維芽細胞、ケラチノサイト、関節軟骨、動脈平滑筋細胞および動脈内皮細胞) を、8週間までの間、静的または動的に、足場上で培養した。操作した組織1つ1つについて、分析を特別にした (それぞれ、代謝活性および細胞数についての、定量的MTTT試験およびDNA試験；グリコサミノグリカンについてのDMMBアッセイ；コラーゲンについてのシリウスレッドアッセイ、培養前寸法についての画像解析および培養後寸法についての画像解析、足場および組織の力学、ならびに定性免疫染色および組織学)。

【0142】

このデータは、ヒト細胞型および動物細胞型が、種々の化学の足場内で、組織に接着し、組織を増殖させ、そして容易に組織を生成したことを示した。しかし、細胞の内殖、分布、方向、および生存能力、ならびに構築物の全体の形態が、細胞型および足場特徴（孔サイズ、VF、繊維密度、分解）の両方によって、影響された。コロニー形成の深さおよび均一性、ならびに軟骨細胞、繊維細胞、平滑筋細胞および内皮細胞によって形成された細胞外マトリクスは、図6aおよび6bに示され、実施例10にてより詳細に考察されるような、3DP足場中の孔サイズに対応する。特に、38ミクロン未満の孔サイズは、細胞接着および増殖を促進せず、そしてその最大の生育および増殖は、75%と比較して、90%の孔隙率を得た。不織布および編みもの（b r a d e）中の繊維芽細胞の方向は、それぞれ、ランダムなポリマー繊維配置または線状のポリマー繊維配置に従った。ナイロンメッシュ上の繊維芽細胞は、その粒子ふるいサイズに依存して、単層または3-D組織を形成した。これらの結果は、足場の特徴を規定することによって、当業者が、インビトロで足場上で、細胞の終点、方向および細胞外マトリクス生成を調節して、移植用に、生存したコンフルエントな組織を一貫して形成し得ることを、示す。

【0143】

（実施例10：組織操作した軟骨構築物）

動脈軟骨欠損は、治癒するための限定された能力を有する。非常に多孔性のPGA足場上で細胞を増殖させることによって作製された、組織操作された構築物は、骨軟骨（o s t e o c h o n d r a l）損傷を修復するために使用されている。組織操作において使用される足場の巨視的アーキテクチャは、細胞取り込みおよびマトリクス堆積に対して、劇的な影響を有し得る。この研究を、軟骨細胞接着、増殖、および軟骨特異的細胞外マトリクスの形成または堆積に対する、足場の孔隙率の効果を試験するために設計した。

【0144】

（材料および方法）：種々の孔隙率および孔サイズのPLLA足場を、上記の3次元プリンティングプロセスを使用して作製した。この足場におけるマクロ孔

質構造を、ポロゲン (porogen)、NaClの組み込み、続いて、この足場からのNaClの浸出によって作製した。この足場の孔隙率を、この足場に組み込んだNaCl粒子に対するポリマーの重量比を変化することによって制御した。8バッチ (batch) のPLLA足場を製造した。8バッチのうち、4つを、75%の塩画分を用いて作製し、そして4つを、90%塩画分を用いて作製し、それぞれ、およその孔隙率75%および90%を有する、足場を得た。さらに、足場の孔サイズを、製作プロセスにおいて特定の粒子サイズのNaClを使用することによって、制御した。この足場製作において使用したNaCl粒子を、サイズ38ミクロン未満、38~63ミクロン、63~106ミクロン、および106~150ミクロンにふるいわけ、これらの粒子サイズによって規定された孔サイズを有する、足場を作製した。1つのバッチの足場を、この2つの孔隙率の各々について、各サイズ範囲で作製した。足場は、直径10mmでありそして2mmの厚さであった。PGAがもつれたメッシュを、コントロール足場として使用した。これは、およその孔隙率97%および90ミクロンの繊維間隔を有する。すべての足場に、若年のヒツジ由来の 4×10^6 一次ヒツジ動脈軟骨細胞を一方の側に、二方向性シリンジ法を介して播種し、そしてバイオリアクターシステム中で4週間培養した。細胞を播種した構築物を、播種後に収集し、MTTによって機能的細胞分布を分析し、そして全細胞数をDNA分析によって分析した。4週の培養後に収集した構築物を、MTT染色、ならびにDNA、硫酸化 (sulfated) グリコサミノグリカン (S-GAG)、およびコラーゲン含量について、分析した。

【0145】

(結果) : この結果を、図6aおよび6bに示す。軟骨細胞が、研究したすべての足場において、ヒアリン様マトリクスに接着、増殖、および堆積することが見出された。この90%多孔質足場は、すべての孔サイズについて、MTT染色したサンプルによって示されるように、この75%多孔質足場よりも、均一な細胞播種を支持した。培養4週間目までに、この細胞は、この90%多孔質足場においては、そのもとの数の5倍を超えるまで、そしてこの75%多孔質足場においては、より少ない程度まで、増殖した。この75%多孔質足場と比較して、よ

り多量 ($p < 0.01$) の硫酸化GAG (図6b) およびコラーゲン (図6a) を、この90%多孔質足場中に見出した。このPGAコントロール足場と同様の量のS-GAGおよびコラーゲンを、この90% 3DP足場において見出した。組織学的サンプルの試験によってもまた、この90%多孔質足場において、より多くの軟骨性マトリクスが生成されたことが、確認された。この足場の孔サイズは、両方の孔隙率について、この定量性測定のいずれ (DNA、S-GAG、およびコラーゲン) に対しても、有意な効果を有さなかった。それに関わらず、両方の孔隙率の足場によって、より均一な細胞播種、および漸増する孔サイズを有する均一に分布したマトリクスが可能になった。

【0146】

この結果は、組織操作した構築物が、この足場構成を制御することによって改変され得ることを、示した。90%多孔質PLLAから構成される3DP足場は、PGA足場と比較した場合に、等価な軟骨マトリクスレベルを含んだ。対照的に、軟骨細胞は、この75%多孔質Ther iForm足場において、かなり少ない ($p < 0.05$) ヒアリン様マトリクスを堆積した。より大きい孔サイズの足場において、より均一な細胞播種、およびサフラニン-O染色されたマトリクスの堆積が、見出された。この研究は、種々の孔隙率および孔サイズの足場が、細胞播種およびマトリクス堆積の、程度および均一性に対して劇的な効果を有し得、これら2つのパラメーターが、細胞の取り込みまたは組織の内殖を、促進または制限のいずれかを行うために変更され得ることを、確立し得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、医療用デバイスを作製するための三次元プリンティングのプロセスの模式図である。

【図2】

図2は、骨に移植可能な軟骨の再生のための複合デバイスを示す。

【図3】

図3a～gは、移植可能デバイスの断面 (二次元) 形状である。

【図4】

図4は、層（図4 a～e）の複合デバイス（図4 f）の略図であり、図4 gにおける千鳥形チャネル設計の断面図を示す（黒塗り部分はポリマーの壁を示す）。

【図5】

図5 a～fは、異なるチャネルサイズ、および溶媒（クロロホルム）の堆積を導くためにマスクを用いて形成された開口部を有する重層化部分により構成される軟骨デバイスのチャネル設計を示す。これは、凝固し、そしてポリマーと一緒に連結し（図5 a～e）単一の多層を形成する（図5 f）。

【図6】

図6 aは、4つの孔サイズ（38ミクロン未満、38～63ミクロン、63～106ミクロン、106～150ミクロン）の1つでの、足場の90%または75%のいずれかの孔隙率の関数としての総コラーゲン（ μg ）のグラフである。

図6 bは、4つの孔サイズ（38ミクロン未満、38～63ミクロン、63～106ミクロン、106～150ミクロン）の1つでの、足場の90%または75%のいずれかの孔隙率の関数としての総硫酸化グリコサミノグリカン（ μg ）のグラフである。

【図1】

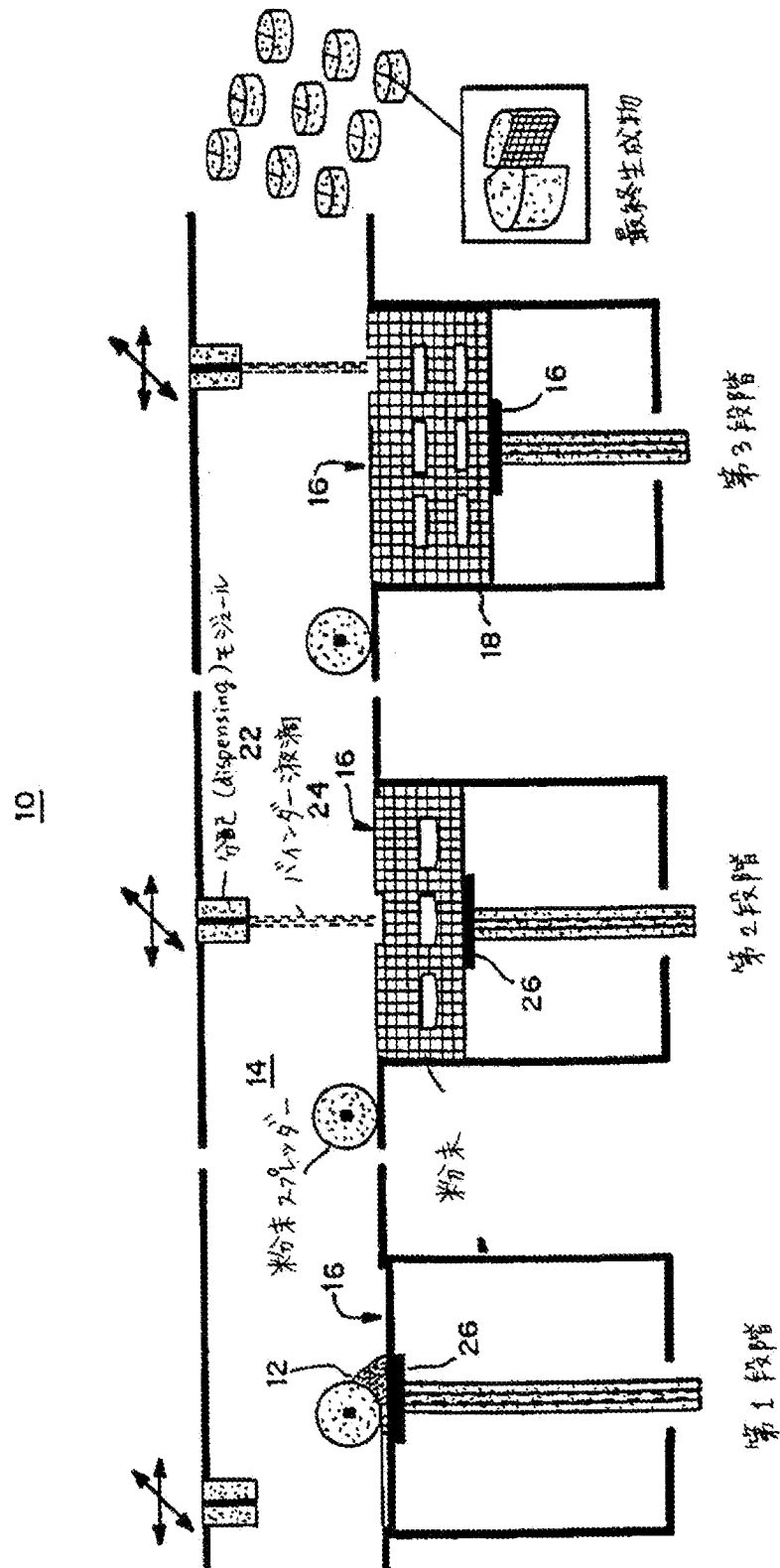
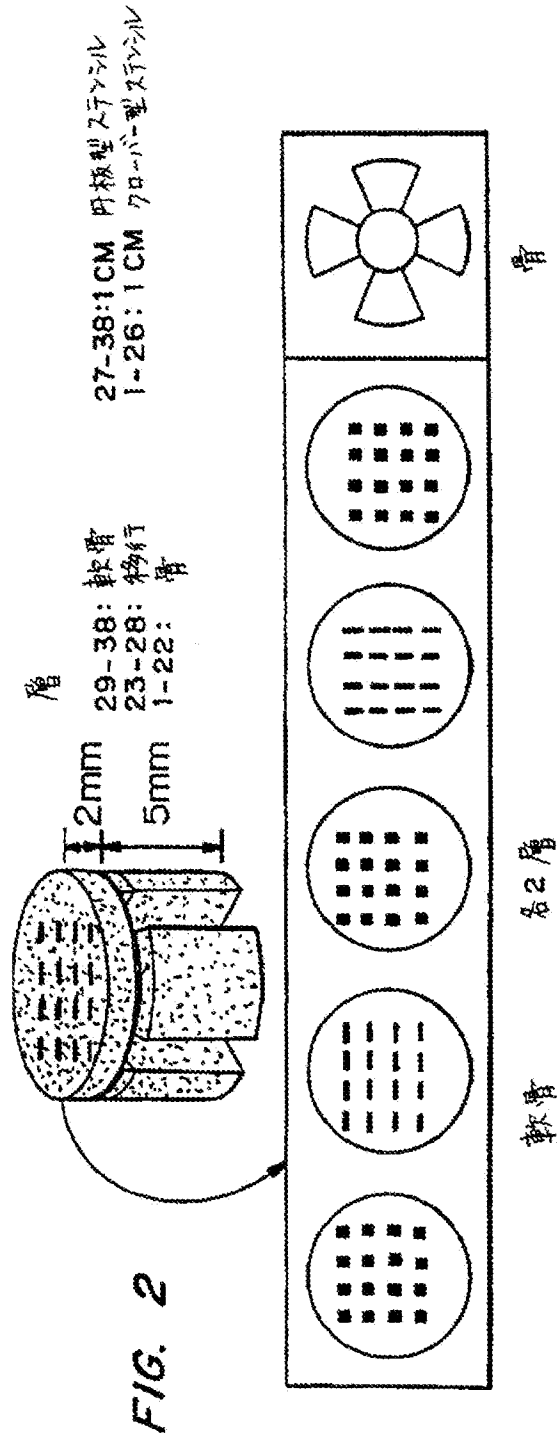
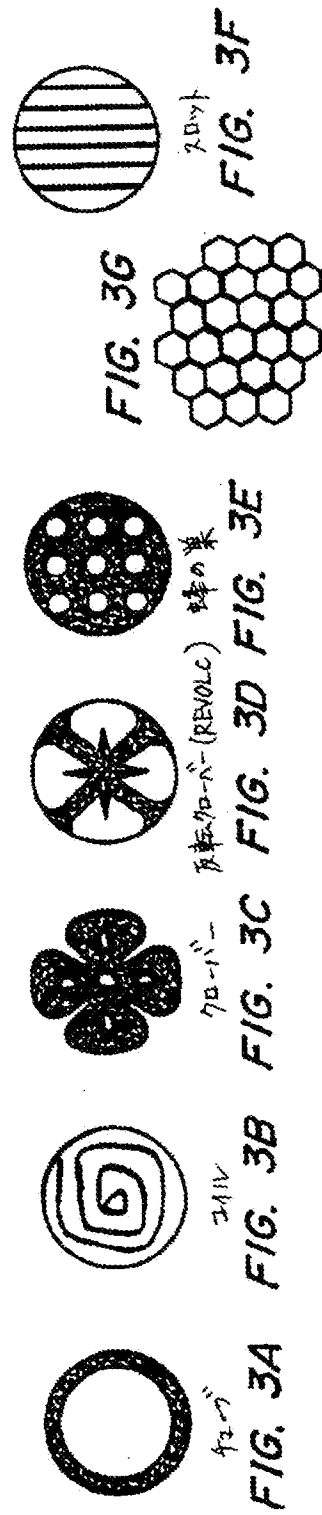


FIG. 1

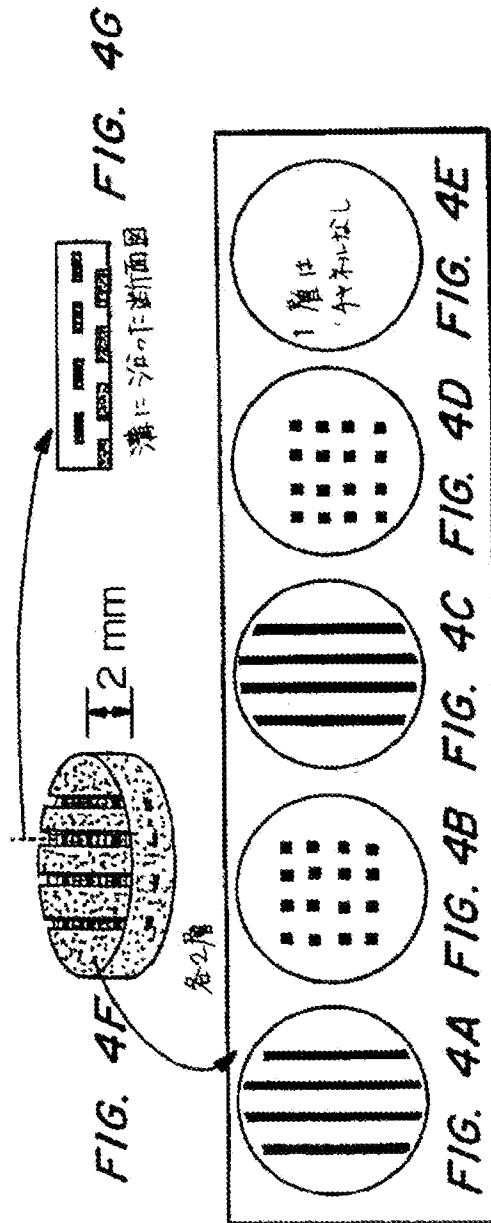
【図2】



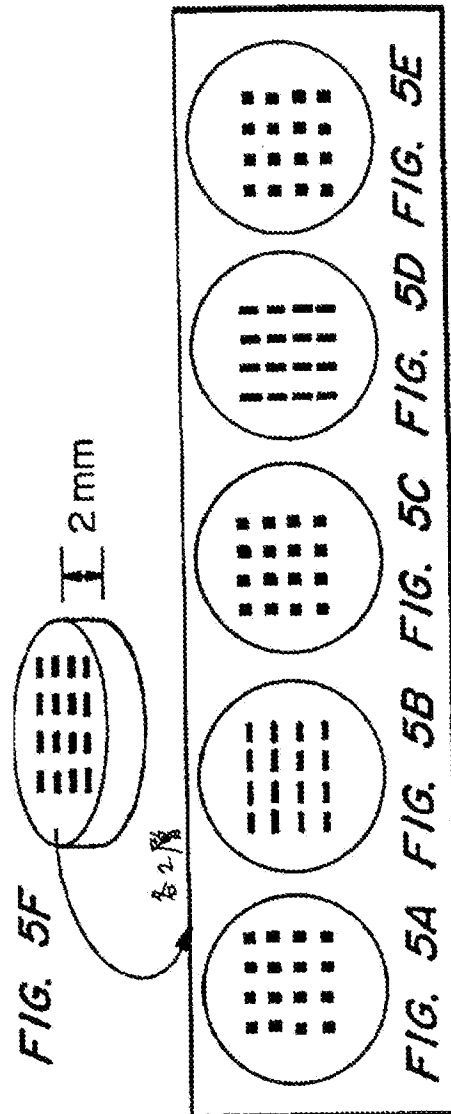
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

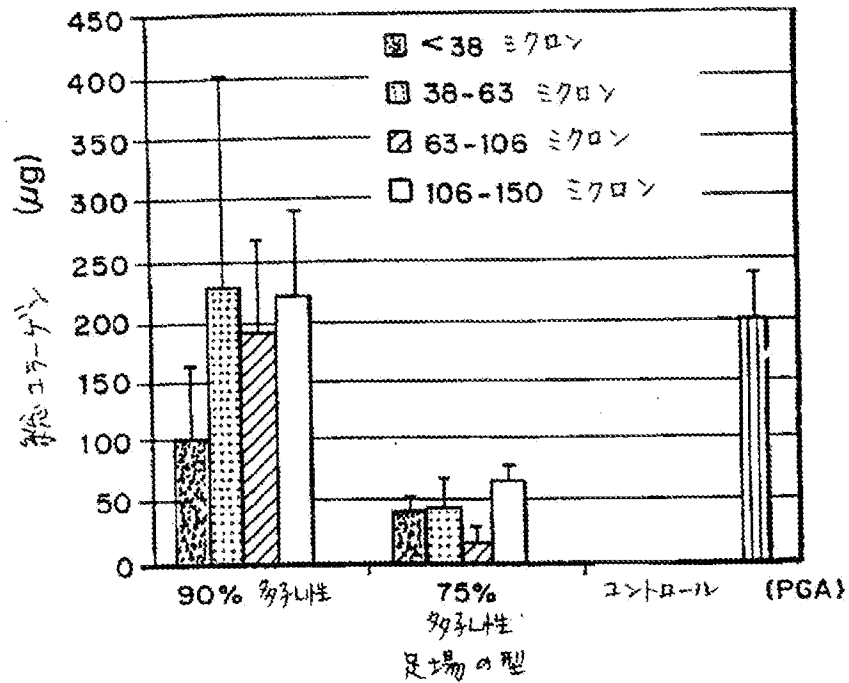


FIG. 6A

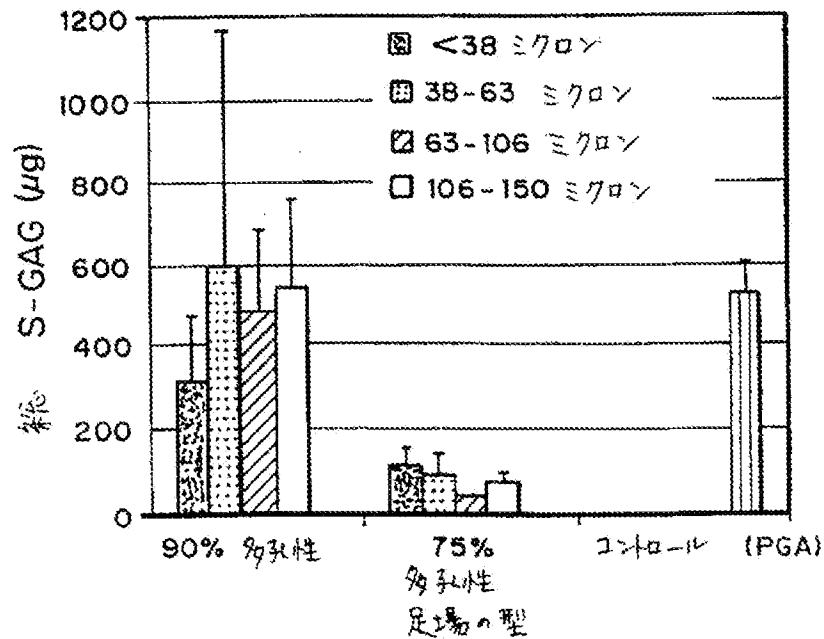


FIG. 6B

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年10月16日(2000.10.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0122

【補正方法】変更

【補正内容】

【0122】

(軟骨バッチA)

バッチAといわれる軟骨デバイスのこのバッチは、L-PLA 27,000 MW (Birmingham Polymers) に対する遊離酸性側鎖を有する、1:1の比のD, L-PLGA (50:50) 50,000 MW (Boehringer Ingelheim) を備えた。このポリマー粒子サイズは、63~106 μm であった。遊離酸性側鎖を有するPLGAは、このデバイスの分解速度を増大させるように選択された。なぜなら標準的なPLGAを用いた以前の結果は、より速い分解が望ましくあり得ることを示唆したからである。90重量%のNaClおよび10%のPLA-PLGA混合物は、高い孔隙率を得るために使用された。この孔サイズは、NaCl粒子サイズ(これは、106~150 μm である)よりも大きいことが予期された。37℃で48時間オービタルシェーカー (orbital shaker) 上で浸出した後に、これらのデバイスは、直径において8.3%および厚さにおいて20%縮小した。このディスクは、硝酸銀アッセイに従って、90%の重量の損失(すなわち、孔隙率)を伴って、7時間後に完全に浸出した。残留クロロホルムは、これらのディスクにおいて検出されなかった(n=5)。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正内容】

【0123】

バッチAは、図4fに示されるように、このデバイスの厚さを完全に通っていない千鳥形チャンネルを備えた。これは、骨領域が巨視的チャンネルを備えていない軟骨-骨複合体デバイスをモデル化することであった。このディスクの直径（すなわち、アーク）を横切る溝を備える層を備える、巨視的千鳥形チャンネル構造が、作製された（図4a～d）。一番下の層は、巨視的チャンネルを備えなかった（図4e）。溝は、この層にある0.675mm幅の切片上にクロロホルムを堆積させないことによって形成された。これらの溝は、2.05mm離れて間隔を空けられた。16個の穴は、これらの溝に重ねられた、デバイスの1番上の表面上に形成された。これらの穴は、1層の溝にプリンティングし、プリンティングベッド（print bed）を90°回転させ、そしてさらなる粉末をまぶすことなく別のセットの溝にプリンティングすることによって形成された。これを、クロロホルムを備えるデバイスマトリクスの重要な部分に効果的に二重プリンティングした。二重プリンティングはまた、ポリマーをより完全に溶解し、それによってこのポリマー粒子間により強い結合を作製することによって、最終デバイスの機械的特性を改善し得る。チャンネルサイズは、実際のデバイスにおいて $182 \pm 37 \mu\text{m}$ であることが観察された。この構造設計の欠陥は、2セットの溝が互いに平行に置かれ、構造的な弱さを潜在的に引き起こすことである。これは、このデバイスが空間的に播種される場合には重要なことではない。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 99/23732		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61F2/28 A61F2/30 A61L27/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61F		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.	
X	WO 96 40002 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ; CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) page 21, line 26 -page 26, line 20 page 28, line 2 -page 29, line 30; figure 2	1,3,4, 6-9,11, 13
X	WO 95 11007 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27 April 1995 (1995-04-27) cited in the application the whole document	1,3,6
Y	WO 98 36739 A (THERICS INC) 27 August 1998 (1998-08-27) claims 1,12; figures	1,4,8,9, 12
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 February 2000	Date of mailing of the international search report 11/02/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2018 Paternoster NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-2018	Authorized officer Klein, C	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/US 99/23732

D.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 514 378 A (CIMA LINDA G ET AL) 7 May 1996 (1996-05-07) cited in the application column 4, line 41 - line 62; figure 1	1,4,8,9, 12
A	US 5 270 300 A (HUNZIKER ERNST B) 14 December 1993 (1993-12-14) cited in the application abstract	5
A	WO 98 41189 A (THERICS INC) 24 September 1998 (1998-09-24)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/23732

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9640002 A	19-12-1996	CA 2222323 A	19-12-1996
		EP 0836453 A	22-04-1998
		JP 11507256 T	29-06-1999
WO 9511007 A	27-04-1995	US 5490962 A	13-02-1996
		US 5518680 A	21-05-1996
		CA 2173318 A	27-04-1995
		EP 0724428 A	07-08-1996
		JP 2930420 B	03-08-1999
		JP 9502999 T	25-03-1996
		US 5869170 A	09-02-1999
WO 9836739 A	27-08-1998	AU 6177198 A	09-09-1998
US 5514378 A	07-05-1996	NONE	
US 5270300 A	14-12-1993	AU 657888 B	23-03-1995
		AU 2541192 A	05-04-1993
		CA 2116859 A	18-03-1993
		EP 0530804 A	10-03-1993
		IL 102988 A	08-02-1998
		JP 7500741 T	26-01-1995
		NQ 940764 A	29-04-1994
		NZ 244060 A	27-07-1997
		WO 9304710 A	18-03-1993
		ZA 9206729 A	12-03-1993
WO 9841189 A	24-09-1998	AU 6868598 A	12-10-1998

 フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)出願人 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 USA

(72)発明者 シャーウッド, ジル ケイ,
アメリカ合衆国 ニュージャージー
08540, プリンストン, ナンバー5,
トリニティー コート 308

(72)発明者 グリフィス, リンダ ジー,
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02139, ケンブリッジ, アントリム
ストリート 110

(72)発明者 ブラウン, スコット
アメリカ合衆国 ニュージャージー
08540, プリンストン, ドラン アベ
ニュー 58

Fターム(参考) 4C081 AB02 AB03 AB04 BA16 BB07
BB08 CA15 CA16 CA17 CD01
CE02 CF02 CF03 DB03
4C097 AA01 BB01 CC01 CC03 DD02
DD07 DD15 EE08 EE16 FF05
SC00